



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **TERAPIA GÉNICA: CONCEITOS E APLICAÇÕES NA MEDICINA DENTÁRIA**

Trabalho submetido por  
**Gonçalo Martins Pereira**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Setembro de 2014**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **TERAPIA GÉNICA: CONCEITOS E APLICAÇÕES NA MEDICINA DENTÁRIA**

Trabalho submetido por  
**Gonçalo Martins Pereira**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutor Pedro Oliveira**

**Setembro de 2014**



Dedico este trabalho à minha família, em particular aos meus pais,  
por me apoiarem sempre em todas as alturas da minha vida



Agradeço ao ISCSEM pela minha formação superior, que culmina nesta tese de  
mestrado

Um grande agradecimento ao meu orientador, Prof. Doutor Pedro Oliveira, por ter  
aceite desde a primeira hora o tema desta tese e pelo apoio constante durante a execução  
da mesma

Agradeço do fundo do coração a toda a minha família pelo amor e carinho constantes

Um agradecimento muito especial à Rita, à Inês, à Andreia, à Margarida e ao João pela  
amizade inabalável





## **Resumo**

A terapia génica pode ser definida como a inserção de um gene funcional em certas células para corrigir uma disfunção celular ou para induzir uma nova função celular. Para a execução desta terapia devem considerar-se diversos elementos como a abordagem, células-alvo, ácidos nucleicos terapêuticos e a transferência génica. A transferência génica, mediada por vetores, é ainda o desafio mais relevante para o sucesso clínico da terapia génica. Os vetores virais são os métodos mais utilizados para esta transferência pois as alternativas não-virais, embora mais seguras, apresentam uma baixa eficácia na entrega dos ácidos nucleicos nas células-alvo. A terapia génica é atualmente explorada para o tratamento de um vasto conjunto de patologias humanas. Também na região maxilofacial tem sido estudada para o tratamento do cancro oral, da hipofunção salivar e xerostomia pós-radioterapia, da dor orofacial e para a regeneração tecidular. Os resultados encorajadores de múltiplos ensaios clínicos em animais e alguns ensaios clínicos humanos permitem concluir que, apesar de faltar um longo caminho, a terapia génica poderá, num futuro próximo, fazer parte do arsenal terapêutico do médico-dentista.

Palavras-Chave: terapia génica; vetores; aplicações; medicina dentária



## **Abstract**

Gene therapy can be defined as the insertion of a functioning gene into cells to correct a cellular dysfunction or to provide a new cellular function. For the execution of this therapy several elements must be considered such as the approach, target cells, therapeutic nucleic acids and gene transfer. Gene transfer, mediated by vectors, is still the most relevant challenge for the clinical success of gene therapy. Viral vectors are the most used methods for this transfer because the non-viral alternatives, despite being safer, present a lower efficacy in the delivery of the therapeutic nucleic acids into the target cells. Gene therapy is currently explored for the treatment of a vast array of human pathologies. In the maxillofacial region this therapy has also been explored for the treatment of oral cancer, radiotherapy-induced salivary hypofunction and xerostomia, orofacial pain and for tissue regeneration. The encouraging results provided by multiple animal clinical trials and some human clinical trials allow the conclusion that, although a long path still remains, gene therapy can in the near future be part of the therapeutic arsenal of the dentist.

Keywords: gene therapy; vectors; applications; dentistry



## Índice

1. Introdução.....	13
2. Desenvolvimento.....	19
2.1. Princípios da Terapia Génica .....	19
2.2. Vetores .....	22
2.2.1. Vetores Virais.....	23
2.2.1.1. Vetores Virais de ARN.....	23
2.2.1.2. Vetores Virais de ADN.....	27
2.2.1.3. Outros Vetores Virais .....	33
2.2.2. Vetores Não-Virais.....	33
2.2.2.1. Métodos Físicos.....	34
2.2.2.2. Métodos Químicos.....	40
2.2.2.3. Métodos Biológicos .....	41
2.3. Aplicações na Medicina Dentária .....	42
2.3.1. Tratamento do Cancro Oral.....	42
2.3.2. Glândulas Salivares .....	43
2.3.2.1. Prevenção e Reparação da Hipofunção Salivar e Xerostomia Pós-Radioterapia .....	44
2.3.2.2. Produção de Proteínas Terapêuticas para Ação Local ou Sistémica .....	46
2.3.3. Regeneração Tecidual Maxilofacial .....	47
2.3.3.1. Periodonto.....	47
2.3.3.2. Articulação Temporo-Mandibular (ATM) .....	50
2.3.3.3. Complexo Pulpo-Dentinário.....	50
2.3.4. Tratamento da Dor Orofacial .....	51
2.3.5. Outras Aplicações .....	53
3. Conclusão.....	55
4. Bibliografia.....	57



## **1. Introdução**

Desde o início da Humanidade que o ser humano procura libertar-se da doença e do sofrimento e afugentar a morte iminente. Seja através do empirismo, religião ou magia o Homem sempre tentou compreender as doenças e alcançar a sua cura. O nascimento da Medicina Científica na Grécia Antiga e a aplicação do método científico permitiram que ao longo dos séculos se tenha aplicado uma nova luz sobre os mesmos problemas. A evolução extraordinariamente rápida no último século de várias áreas científicas, como a medicina, a biologia celular e molecular e a microbiologia, entre outras, permitiram compreender a etiologia e fornecer terapêuticas para a maioria das patologias (Escors & Breckpot, 2012). A genética e a sequenciação do genoma humano em 2001 contribuíram bastante para esclarecer a base fisiopatológica das doenças, bem como fornecer novas terapêuticas baseadas geneticamente para o seu tratamento (Pezzoli & Candiani, 2013).

Keeler (1947) escreve pela primeira vez sobre terapia génica, definindo-a como uma “técnica terapêutica” que permite a “correção permanente de doenças hereditárias”. Contudo, os princípios que atualmente constituem a terapia génica surgem apenas nos anos 60 do século XX. Apesar de não ser um conceito biomédico absolutamente recente, a sua definição específica permanece ainda esquiva. A terapia génica, ou terapia de substituição génica, pode ser definida de forma simples como a inserção de um gene funcional em células para corrigir uma disfunção celular ou para induzir uma nova função celular (Escors & Breckpot, 2012).

É no final do anos 70 do último século que a terapia génica surge como alternativa biomédica realista para a correção de doenças genéticas, através de um conceito simples: restaurando o gene, cura-se a doença (Escors & Breckpot, 2012). Rogers et al. (1973) demonstraram a ocorrência de uma transferência génica mediada por vírus e, motivados pelos resultados, foram mais longe e, anos mais tarde, realizaram o primeiro ensaio clínico de terapia génica em humanos. Este ensaio apresentou resultados negativos, pois a sua premissa, de que o vírus continha no seu genoma o gene da arginase, revelou-se mais tarde falsa (Wirth, Parker, & Ylä-Herttuala, 2013). Apesar dos resultados, após este ensaio a terapia génica torna-se uma possibilidade real, surgindo em consequência questões éticas e práticas (Fletcher & Anderson, 1980).

Em 1980, Martin Cline, hematologista e geneticista americano, conduz sub-repticiamente a primeira experimentação clínica nesta área em dois doentes com talassémia, sem efeito terapêutico. Esta tentativa foi vigorosamente criticada, quer científica, quer eticamente, uma vez que não se baseava em qualquer base experimental sólida. Para além de não ter autorização por parte das autoridades norte-americanas o tratamento foi efetuado em Israel e Itália, países nos quais não existia legislação específica para esta área. O investigador foi posteriormente sancionado (Giacca, 2010).

No dia 14 de Setembro de 1990 a *Food and Drug Administration* (FDA) aprova pela primeira vez um ensaio clínico de terapia génica com objectivo terapêutico em humanos (Wirth et al., 2013). Duas crianças com deficiência de deaminase de adenosina (ADA-SCID), uma doença genética monogénica que gera imunodeficiência severa, foram tratadas com leucócitos do seu próprio sangue, alterados geneticamente *ex vivo* através de  $\gamma$ -retrovírus para expressarem o gene normal deste enzima. Um dos pacientes apresentou uma resposta temporária ao tratamento, sendo a resposta no segundo paciente bastante mais limitada. Apesar de bem sucedido em termos de segurança, ficou incerto se o tratamento trouxe verdadeiros benefícios terapêuticos pois os pacientes continuaram a receber ADA exógena para o controlo da doença (Blaese et al., 1995). Não obstante, ambas as crianças, agora adultas, vivem normalmente com um sistema imunitário funcional (Lewis, 2013).

Após este ensaio clínico, os anos 90 assistiram ao início de um crescente número de ensaios. Durante este período algumas vozes expressaram preocupação em relação aos perigos potenciais dos procedimentos e críticos apontaram o facto de a terapia génica ter provado pouco benefício terapêutico até à altura. De forma a avaliar esta área e fornecer recomendações quanto ao seu investimento, Harold Varmus, diretor dos *National Institutes of Health* (NIH), nomeou uma comissão *ad hoc* que, no dia 7 de Dezembro de 1995, apresenta as suas conclusões. Se por um lado este relatório, denominado como relatório Orkin-Motulsky, salienta o enorme potencial da terapia génica, por outro critica a falta de bases científicas, fisiopatológicas e da interação vectores-hospedeiro, e o facto de muitos dos resultados obtidos em ensaios clínicos não terem trazido informação útil por falhas científicas e protocolares (Orkin & Motulsky, 1995). Alguns autores consideram este relatório excessivamente crítico (Kimmelman, 2008).



Em 1999, o número de ensaios clínicos atingiu o seu pico, com 116 ensaios aprovados. Contudo, neste ano, o pior efeito adverso de qualquer experimentação em humanos tornou-se realidade (Wirth et al., 2013). Jesse Gelsinger, um jovem de 18 anos com deficiência de ornitina transcarbamilase (doença genética ligada ao cromossoma X que leva a um erro na síntese de ureia), desenvolve a síndrome da resposta inflamatória sistémica após administração intra-vascular do vector viral, morrendo quatro dias depois por falência multi-orgânica (Raper et al., 2003). Esta morte foi particularmente relevante pois trata-se da primeira num ensaio clínico de terapia génica e encontra-se diretamente ligada ao vector viral usado no tratamento (Wirth et al., 2013).

Este acontecimento teve um profundo impacto na área e levou a FDA a interromper uma série de ensaios clínicos. Foram identificadas falhas na comunicação com entidades reguladoras, nos consentimentos informados, no processo de seleção de candidatos e protocolo clínico e conflitos de interesse financeiro (Wilson, 2009). Desde então a área da terapia génica tem estado sobre intenso escrutínio de cientistas, governos e público em geral (Sheridan, 2011).

Mais tarde, em 2003, duas crianças com imunodeficiência combinada severa ligada ao X (SCID-X1), devido a mutação do gene da cadeia gama do receptor de interleucinas, tratadas com sucesso por transdução de células estaminais hematopoiéticas mediada por retrovírus (Hacein-Bey-Abina et al., 2002) desenvolveram leucemia devido ao fenómeno de mutagénesis insercional (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Em 2007, mais duas crianças do mesmo ensaio desenvolveram a mesma neoplasia. Porém, as crianças que não desenvolveram leucemia e as que a desenvolveram e entraram em remissão após tratamento oncológico recuperaram a função imunitária, beneficiando da terapia génica (Hacein-Bey-Abina et al., 2008).

Estes efeitos adversos em ensaios clínicos alimentaram o debate sobre o futuro da terapia génica e levaram a que sociedades científicas europeias e norte-americanas avaliassem de uma forma crítica o rácio risco/benefício (Edelstein, Abedi, Wixon, & Edelstein, 2004; Deakin, Alexander, & Kerridge, 2009). Em resposta a um artigo sensacionalista publicado na revista *Nature*, a Sociedade Americana de Terapia Génica em conjunto com a sua homóloga europeia publicaram uma carta na qual afirmam: “*The field of gene therapy is working to develop new and better methods to treat a variety of severe disorders, including genetic diseases such as hemophilia and SCID, and also*

*cancer and AIDS. The clear-cut therapeutic benefits seen in recent clinical trials of gene therapy for XSCID and ADA-deficient SCID warrant judicious consideration of the benefits and risks of this approach compared to imperfect alternatives, such as haplo-identical hematopoietic stem cell transplantation.” (Kohn & Günsbacher, 2003).* Analisando a morte de Jesse Gelsinger e as suas consequências, Steinbrook (2008) conclui: *“The death of Jesse Gelsinger has taught the medical community and society about how to make clinical research safer. Research, however, is still research. Only a minority of clinical trials will show benefit. Adverse events are inevitable. Some will continue to be unexpected, and tragic.”.*

Estas mortes em ensaios clínicos, às quais se juntam mais duas, em 2006 e 2007, estas não diretamente relacionadas à terapia génica (Evans, Ghivizzani, & Robbins, 2008), permitiram melhorá-la e torná-la mais segura (Lewis, 2013). Os recentes sucessos, com segurança, que esta terapia alcançou no tratamento de certas doenças genéticas, caracterizadas por morbilidade e mortalidade consideráveis e para as quais não existiam tratamentos e cura disponíveis, permitiram relançar a terapia génica passando-a por fim do domínio ficcional para a realidade (Macpherson & Rasko, 2014).

O número de ensaios clínicos aprovados em todo o mundo tem variado desde 1989 (figura 1 do anexo). A tendência de aumento verificada até 1999 estagnou após a morte de Jesse Gelsinger, mantendo-se relativamente constante até aos dias de hoje e diminuindo nos anos imediatamente a seguir ao relato de reações adversas. Contudo, 2005, 2006 e 2008 foram anos importantes com 112, 117 e 118 ensaios clínicos aprovados, respetivamente (Ginn, Alexander, Edelstein, Abedi, & Wixon, 2013).

Os mais de 1800 ensaios executados ou a decorrer até hoje ocorreram em 31 países, com representantes dos 5 continentes (figura 2 do anexo). A sua distribuição geográfica não se alterou muito nos últimos dez anos; é nos Estados Unidos da América que decorrem a maioria dos ensaios (63,4%), seguido do continente europeu (24,2%). O cancro é a doença sobre a qual a maioria dos ensaios incide (64,4%), seguida das doenças genéticas monogénicas (8,7%), doenças cardiovasculares (8,4%) e doenças infecciosas (8%), entre outras (figura 3 do anexo). Os ensaios clínicos fase I são os mais frequentes (59,6%), encontrando-se apenas dois ensaios em fase IV, como é visível na figura 4 do anexo (Ginn et al., 2013).

Em 2003 a República Popular da China tornou-se no primeiro país no Mundo a aprovar terapia génica para uso clínico. Desenvolvido pela SiBiono GeneTech, o Gendicine™ trata-se de um adenovírus serotipo 5 não-replicativo no qual a região E1 é substituída pelo gene do p53 humano, estando indicado para o tratamento do carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço (Peng, 2005). Porém, a aprovação ocorreu sem dados provenientes de ensaios clínicos fase III e posteriormente levantaram-se questões sobre a qualidade dos ensaios executados e, em consequência, sobre a segurança e eficácia da terapia. Dois anos após a aprovação do Gendicine™, a *China Food and Drug Administration* aprova outra terapia génica: o Oncorine™. Ao contrário do anterior, este produto trata-se de um adenovírus condicionalmente replicativo para o tratamento do cancro nasofaríngeo refratário avançado, em combinação com a quimioterapia (Wirth et al., 2013).

Uma empresa farmacêutica europeia, a Ark Therapeutics Group, inicia em 2004 a produção de sitimagene ceradenovec (Cerepro®): um adenovírus contendo o gene HSV-Tk que, juntamente com a administração sistémica de ganciclovir, pretendia o tratamento de gliomas malignos. Este gene produz uma enzima que converte o ganciclovir administrado num agente citotóxico, eliminando assim as células neoplásicas. Após vários estudos pré-clínicos e ensaios em humanos, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) deu, em 2009, um parecer negativo sobre este produto por este não apresentar evidência suficiente de benefícios clínicos e de, em consequência, os riscos ultrapassarem os potenciais benefícios. Após esta avaliação, a empresa decidiu retirar o pedido de autorização de entrada no mercado do Cerepro® (van Putten, Dirven, van den Bent, & Lamfers, 2010).

Mais recentemente, a Rússia tornou-se, à semelhança da China, num país pioneiro na terapia génica ao aprovar em Dezembro de 2011 um produto para a doença arterial periférica. Denominado Neovasculgen®, este produto trata-se de um plasmídeo que contém o gene do fator de crescimento do endotélio vascular, através do qual há o estímulo para a angiogénese. Apesar de se encontrarem em uso clínico na China e Rússia, nenhum destes produtos aprovados (Gendicine™, Oncorine™ e Neovasculgen®) foi submetido aos estudos clínicos requeridos para aprovação nos Estados Unidos ou União Europeia (Ledley, McNamee, Uzdil, & Morgan, 2014).

Por fim, e pela primeira vez num país ocidental, um produto de terapia génica – alipogene tiparvovec ou Glybera® – recebe aprovação pela União Europeia para comercialização, em Novembro de 2012 (Wirth et al., 2013).

Originalmente desenvolvido pela Amsterdam Molecular Therapeutics e atualmente comercializado pela UniQure, o alipogene tiparvovec consiste num vector viral adeno-associado não-replicativo e não-integrante que expressa a lipase lipoproteica no tecido muscular para o tratamento da deficiência severa desta enzima, uma doença genética potencialmente fatal para a qual não há nenhuma terapêutica farmacológica disponível (Gaudet et al., 2010).

Desde o primeiro pedido de autorização de comercialização, em Dezembro de 2009, o Glybera® falhou por três vezes receber uma recomendação positiva da Comissão para Produtos Medicinais Humanos, a entidade que confere as recomendações finais para posterior autorização ou recusa pela EMA. Apesar da segurança e tolerância do produto terem sido reconhecidas desde a primeira avaliação, a sua eficácia não foi inicialmente considerada provada. Finalmente, em 2012, a Comissão para Terapias Avançadas e a Comissão para Produtos Medicinais Humanos, dispondo de novos dados, aprovaram o Glybera® para pacientes adultos diagnosticados com deficiência familiar em lipase lipoproteica e que sofram de pancreatites múltiplas ou severas apesar de restrições alimentares (Bryant et al., 2013).

Apesar da terapia génica ter tido um percurso sinuoso atualmente emerge como uma área promissora, resultado de vários avanços técnicos e do tratamento bem-sucedido de várias condições médicas graves. Esta recente aprovação pela União Europeia demonstrou que os desafios técnicos e regulatórios existentes no desenvolvimento dos produtos de terapia génica foram agora superados, abrindo portas para novas autorizações num futuro próximo (Melchiorri et al., 2013).

## 2. Desenvolvimento

### 2.1. Princípios da Terapia Génica

A terapia génica pode ser classificada de acordo com a natureza da célula-alvo ou segundo o local onde é efectuada, isto é, dentro ou fora do organismo humano (Ibraheem, Elaissari, & Fessi, 2014). Assim, podemos considerar:

- Terapia Génica Somática: realizada em células somáticas, não sendo transmitida aos descendentes. Inclui-se também a terapia realizada a nível fetal;
- Terapia Génica Germinal: aplicada a células germinais (gâmetas ou zigoto) é transmissível à descendência. (Nota: devido à possibilidade de ter fins eugénicos ou disgénicos, todas as instâncias médicas, científicas, éticas e políticas condenaram e proibiram este tipo de terapia génica);
- Terapia Génica *ex vivo*: as células-alvo são recolhidas do doente, tratadas *in vitro* e, posteriormente, reintroduzidas no organismo;
- Terapia Génica *in vivo*: a transfeção ou transdução ocorre com as células-alvo no organismo humano, motivo que levanta múltiplas dificuldades. No caso de ser possível definir um território do organismo com uma via de acesso específica denomina-se terapia génica *in situ*;

A Agência Europeia de Medicamentos define que um produto médico de terapia génica deve cumprir duas características: conter uma substância ativa que inclui ou consiste num ácido nucleico recombinante usado ou administrado no ser humano tendo em vista a regulação, reparação, substituição, adição ou supressão de uma sequência genética e, segundo, que o efeito terapêutico, profilático ou diagnóstico esteja diretamente relacionado com a sequência de ácidos nucleicos recombinantes que contém ou com o produto da expressão genética destes. A FDA define terapia génica como produtos que medeiam os seus efeitos pela transcrição e/ou translação de material genético transferido e/ou por integração no genoma do hospedeiro e que são administrados como ácidos nucleicos, vírus ou microorganismos resultantes de engenharia genética; os produtos podem ser usados para modificar células *in vivo* ou transferidos para as células *ex vivo* previamente à administração no receptor (Wirth et al., 2013).

Apesar de teoricamente o princípio da terapia génica ser simples, na prática trata-se de uma operação complexa (Ibraheem et al., 2014). Após a escolha do ácido nucleico

terapêutico e da célula-alvo, deve ser determinada a via de administração e sistema de entrega do gene, ponderando a expressão e persistência do gene, bem como a resposta imunitária a esta terapia (Giacca, 2010).

Embora a escolha do ácido nucleico terapêutico e da célula-alvo estejam dependentes da fisiopatologia da doença sobre a qual se pretende intervir, na selecção do ácido nucleico deve ser tomada em consideração a estratégia de modificação das células-alvo (figura 5 do anexo). Podem ser identificadas cinco estratégias para esta modificação (Strachan & Read, 2011):

- Adição Génica: introdução de uma cópia funcional do gene nas células de forma a suplementar um gene não funcional;
- Eliminação de Mutações Patogénicas: substituição da sequência que contém a mutação patogénica por uma sequência normal equivalente;
- Inibição da Expressão Génica: introdução de ácidos nucleicos terapêuticos na célula que inibem a expressão do gene mutado;
- Morte Direta de Células Afetadas: introdução no genoma da célula-alvo de genes que produzem toxinas ou genes que metabolizam fármacos em produtos citotóxicos;
- Morte Assistida de Células Afetadas: a expressão dos genes introduzidos na célula-alvo desencadeia uma resposta imunitária que conduz à lise celular (Imunoterapia);

Os ácidos nucleicos utilizados na terapia génica podem ser classificados segundo a sua composição química e segundo a sua função. Do ponto de vista químico temos os ácidos nucleicos de ADN e os de ARN (Pushpendra, Arvind, & Anil, 2012). Giacca (2010) classifica-os segundo a função em ácidos nucleicos codificadores de proteínas e não-codificadores de proteínas (tabela 1 do anexo). Este último grupo tem essencialmente uma função reguladora da expressão génica (Pushpendra et al., 2012). Ainda segundo a função, Pezzoli & Candiani (2013) classificam os ácidos nucleicos em substitutos, inibidores e vacinas.

As proteínas codificadas pelos genes terapêuticos podem ter diferentes funções, desde a substituição de uma proteína ausente até à modulação do sistema imunitário (Giacca, 2010). Os genes codificadores de antigénios, citoquinas, genes supressores de tumores e de enzimas “suicidas” são os mais utilizados atualmente nos ensaios clínicos de terapia

génica (55,3%) por serem os agentes primários no combate ao cancro, a doença com mais ensaios clínicos registados (figura 6 do anexo). Apenas 1,8% dos ensaios clínicos envolve a transferência de ácidos ribonucleicos (Ginn et al., 2013).

## 2.2. Vetores

O sucesso de qualquer procedimento de transferência génica, quer *ex vivo* quer *in vivo*, depende grandemente da eficiência da internalização dos ácidos nucleicos pelas células-alvo. De facto, tornar a transferência génica mais eficaz representa ainda o desafio mais relevante para o sucesso clínico da terapia génica (Giacca, 2010).

Apesar da administração direta de plasmídeos contendo o gene terapêutico (*naked DNA*) nas células e tecidos ser o método de transferência mais básico e seguro (Pezzoli & Candiani, 2013), o tamanho, natureza aniónica e a sensibilidade às nucleases do ADN impossibilitam a sua passagem passiva pela membrana celular (Kamimura, Suda, Zhang, & Liu, 2011). De forma a garantir o transporte do gene terapêutico para a célula-alvo, protegendo-o da degradação pelas nucleases e assegurando a transcrição no interior da célula, o ADN tem de ser associado a um sistema de entrega, ou vetor (Ibraheem et al., 2014).

O vetor ideal deve satisfazer vários critérios, tais como: não desencadear uma resposta imunitária severa, transportar ácidos nucleicos independentemente do seu tamanho, conduzir a uma expressão regular e sustentada da sua carga genética, especificidade na entrega dos genes, infetar células em divisão e células que não se encontram em divisão (células quiescentes), fácil de preparar, barato e disponível comercialmente em concentrações elevadas e permanecer em posição episomal ou integrar uma região específica do genoma, sem integração aleatória (Ibraheem et al., 2014). Nenhum vetor reúne, até à data, todas estas características (Macpherson & Rasko, 2014).

Podem considerar-se dois grandes grupos de vetores: os virais e os não-virais. A transferência de material genético através de métodos virais denomina-se transdução e através de métodos não-virais denomina-se transfeção (Giacca, 2010).

Apesar dos métodos não-virais estarem a tornar-se cada vez mais utilizados, os vetores baseados em vírus são ainda a abordagem mais frequente, sendo utilizados em aproximadamente dois terços (66,8%) dos ensaios clínicos (figura 7 do anexo). Isto deve-se ao facto de os vetores virais serem, ainda, o veículo que garante maior eficácia na transferência do material genético para as células-alvo (Ginn et al., 2013).



### **2.2.1. Vetores Virais**

Um vírus é uma entidade biológica constituída por ácidos nucleicos envoltos num esqueleto proteico que consegue invadir o núcleo das células do hospedeiro e subverter a maquinaria celular para seu proveito próprio, isto é, para expressar o material genético viral e replicá-lo, para a invasão de outras células em seguida. Estas características, aprimoradas por milhões de anos de evolução, tornaram os vírus alvos tentadores para a terapia génica (Collet, Grillon, Nadim, & Kieda, 2013).

Para usar um vírus como vetor para a transferência de um gene este deve ser modificado através de engenharia genética, de forma a manter, alterar ou eliminar o seu genoma, tropismo, patogenicidade, imunogenicidade e persistência. Assim, a parte patogénica do genoma viral é removida e alterada para receber o gene terapêutico, ao mesmo tempo que se retêm ou alteram as estruturas não-patogénicas que permitem a infeção celular, como as proteínas do envelope viral (Bouard, Alazard-Dany, & Cosset, 2009). O resultante vírus não-patogénico, que contém o ácido nucleico terapêutico, é denominado vetor viral (Ibraheem et al., 2014; Macpherson & Rasko, 2014).

Os vetores virais utilizados na terapia génica podem ser divididos, segundo a composição do seu genoma, em vírus de ARN e vírus de ADN (Kamimura et al., 2011).

#### **2.2.1.1. Vetores Virais de ARN**

A família *Retroviridae* compreende uma vasta série de vírus com uma cadeia de ácido ribonucleico simples, linear e com polaridade positiva que partilham uma estrutura genética e ciclos replicativos comuns. Existem duas características peculiares transversais a todos os elementos desta família: um fluxo reverso da informação genética e integração no genoma da célula hospedeira. Após a internalização na célula, a enzima viral transcriptase reversa converte o genoma viral ribonucleico numa molécula de ADN que é transportada para o núcleo e integrada no genoma do hospedeiro, denominando-se provírus e servindo para a futura produção de novos vírus (Goff, 2013).

Os membros desta família de vírus têm sido classificados segundo diferentes critérios como a sua morfologia, hospedeiro animal, tipo de doença causada e tropismo para

diferentes tipos celulares, entre outros (Giacca, 2010). A classificação taxonómica mais recente considera que a família *Retroviridae* é composta por sete géneros (Goff, 2013).

Numa classificação mais útil para a terapia génica dividem-se os retrovírus em três grandes grupos: os oncoretrovírus (nos quais se destacam os gamaretrovírus), os lentivírus e os spumaretrovírus. Devido à complexidade da sua organização genética, os vírus pertencentes aos dois últimos grupos são também denominados retrovírus complexos (Kamimura et al., 2011).

A engenharia de vetores baseados em gamaretrovírus, desenvolvidos a partir do vírus Moloney da leucemia murina, iniciou-se nos anos 80 tornando-se nos primeiros vetores usados em terapia génica humana (Macpherson & Rasko, 2014).

Estes vetores retrovirais tornaram-se bastante populares até ao início do século XXI (Giacca, 2010) devido à sua relativa simplicidade de uso, incapacidade de replicação viral, elevada eficiência na transdução de células em replicação, baixa imunogenicidade e integração estável do genoma viral no genoma do hospedeiro, teoricamente garantindo uma expressão transgénica a longo prazo (Vannucci et al., 2013).

A integração, apesar de ser uma vantagem bastante significativa, é na verdade uma “faca de dois gumes” pois representa *per se* um fenómeno mutagénico (Kamimura et al., 2011). Durante muito tempo foi assumido que a integração era perto de aleatória (Vannucci et al., 2013) e, consequentemente, a probabilidade de esta ocorrer num local crítico ou perigoso do genoma, algo teoricamente possível, era mínima (Macpherson & Rasko, 2014). Contudo, desde 2002, modelos animais e lamentáveis efeitos adversos em ensaios clínicos em humanos revelaram que o risco genómico é, na verdade, bastante significativo, podendo desencadear um largo espectro de fenómenos desde imortalização *in vitro* até dominância clonal e oncogénese *in vivo*, denominada oncogénese insercional (Biasco, Baricordi, & Aiuti, 2012). Isto deve-se ao facto de a integração dos vetores gamaretrovirais ocorrer preferencialmente em zonas próximas a regiões reguladoras da expressão génica, o que pode conduzir à ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumores (LaFave et al., 2014).

De forma a evitar a genotoxicidade associada a estes vetores têm sido desenvolvidas diversas estratégias, tais como: estudo em modelos animais, identificação precisa do perfil de inserção e mecanismos celulares envolvidos, orientação da integração para

locais predeterminados do genoma ou *genomic safe harbours*, vetores auto-inativantes, promotores celulares em substituição dos virais, modificação das proteínas do envelope viral ou *pseudotyping*, inserção de isolantes (*insulators*), recombinação homóloga com recurso a nucleases e a utilização de transposições (Yi, Noh, & Lee, 2011).

Para além do fenómeno de mutagénese insercional, ou transformação insercional, os vetores gamaretrovirais apresentam outras limitações como a sua construção e produção, impossibilidade de comportar genes terapêuticos de dimensão superior a 6-7 kb, incapacidade de transdução de células quiescentes e o progressivo silenciar da expressão génica terapêutica nas células transduzidas (Giacca, 2010; Vannucci et al., 2013). Todas estas questões, com particular destaque para a genotoxicidade, levaram a que estes vetores tenham assistido a um declínio no seu uso em ensaios clínicos, estando atualmente apenas presentes em 19,7% dos ensaios (Ginn et al., 2013).

Os primeiros vetores baseados em lentivírus, ou lentivetores, e até hoje os mais amplamente usados, foram desenvolvidos a partir do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 com o intuito de ultrapassar as limitações dos vetores gamaretrovirais (Escors & Breckpot, 2010).

Ao longo da última década pelo menos três gerações diferentes de lentivetores foram produzidas, cada uma trazendo melhorias significativas em relação à geração precedente. O sistema de produção de terceira geração apenas necessita de três dos nove genes do VIH-1, algo que permite aumentar o perfil de segurança do vetor pois reduz a probabilidade de recombinação e de criação de vetores replicativos. Este facto é de extrema importância pois o VIH-1 é um agente patogénico humano para o qual ainda não existe cura (Giacca, 2010).

Os lentivetores apresentam-se como mais vantajosos que os vetores gamaretrovirais pois, para além das mesmas vantagens, têm ainda a capacidade de transduzir células quiescentes e de transportar genes terapêuticos de dimensão superior, entre 9-10 kb (Vannucci et al., 2013).

Tratando-se de vetores integrantes, os lentivetores induzem igualmente o fenómeno de mutagénese insercional (Escors & Breckpot, 2010). Contudo, e ao contrário dos vetores gamaretrovirais, que preferem a integração em regiões reguladoras da expressão génica, os vetores baseados em lentivírus integram o material genético no interior dos genes.

Este perfil de integração reduz significativamente por si só o risco de genotoxicidade, de acordo com vários estudos que avaliaram o potencial oncogénico destes vetores, quer *in vivo* quer *in vitro* (Biffi et al., 2011). Todavia, a integração lentiviral e o risco oncogénico dependem de múltiplas variáveis, pelo que existe sempre, embora residual, um potencial de gerar oncogénese insercional. Desde o primeiro ensaio clínico com lentivetores, em 2006, que não se detetam efeitos adversos, genotóxicos ou outros, nos indivíduos intervencionados (McGarrity et al., 2013).

Com o objetivo de melhorar o perfil de segurança e a eficiência de transdução destes vetores têm sido exploradas diversas alterações estruturais, como: introdução de elementos regulatórios pós-transcricionais, introdução de promotores específicos de células e tecidos e *pseudotyping* para aumentar o tropismo viral, produção de lentivetores auto-inativantes para diminuir a probabilidade de surgimento de vetores replicativos e produção de lentivetores não-integrantes, para reduzir a genotoxicidade. Apesar destas modificações, existem ainda dificuldades em obter concentrações elevadas do vetor durante a sua produção (Schambach, Zychlinski, Ehrnstroem, & Baum, 2013).

Os lentivetores, por terem sido desenvolvidos mais recentemente, estão atualmente presentes em apenas 2,9% dos ensaios clínicos (Ginn et al., 2013). Devido a algumas preocupações pela utilização de vetores baseados no VIH-1, outros lentivírus não-humanos têm sido estudados como vetores. Também os spumaretrovírus e os alfaretrovírus têm sido explorados como alternativas aos vetores retrovirais atualmente disponíveis (Vannucci et al., 2013).

### 2.2.1.2. Vetores Virais de ADN

Os principais vetores virais com genoma desoxiribonucleico atualmente em uso derivam de adenovírus, vírus adeno-associados ou vírus herpes simplex (Kamimura et al., 2011).

A família *Adenoviridae* é formada por quatro géneros: *Mastadenovirus*, isolados de mamíferos; *Aviadenovirus*, isolados de aves; *Atadenovirus*, isolados de répteis, aves, um marsupial e outros mamíferos; e *Siadenovirus*, isolados de um réptil e aves. Cinquenta e sete tipos (anteriormente denominados serotipos) de adenovírus humanos foram reconhecidos e são classificados em sete espécies (A-G) com base na serologia, hemaglutinação, oncogenicidade em roedores, transformação de culturas de células primárias e sequenciação do genoma viral (Wold & Ison, 2013). Os vetores baseados em adenovírus mais investigados e usados em terapia génica pertencem à espécie C tipo 2 e 5 (Giacca, 2010).

Os adenovírus são vírus icosaédricos sem envelope viral, com cerca de 90 nm de diâmetro, e um genoma de ADN linear de cadeia dupla de 36 kb. A cápside viral é constituída por três elementos: hexão, pentão e fibra. O hexão é o principal responsável pela elevada imunogenicidade destes vírus, ao passo que a fibra é um elemento-chave no tropismo viral (Rebello-de-Andrade & Gíria, 2014).

A produção de vetores adenovirais, focada em garantir a sua incapacidade de replicação, tem atravessado várias etapas geracionais de desenvolvimento (Vannucci et al., 2013). A primeira geração destes vectores, com deleções dos genes E1 e E3, apresenta uma capacidade transgénica até 8,3 kb mas, devido à permanência da maioria do genoma viral, a resposta imunitária desencadeada e respetiva citotoxicidade limitaram o seu uso. Com deleções mais extensas, nas regiões E2 e E4, a segunda geração de adenovetores apresenta uma resposta imunitária e inflamatória reduzida, mas ainda problemática. Mais recentemente, a terceira geração destes vetores, denominados *gutless* ou *helper dependent*, é produzida com uma deleção quase total dos genes virais. Este facto confere-lhes, para além de incapacidade de replicação, uma grande capacidade de transporte ( $\approx 36$ kb) e imunogenicidade limitada (Mohit & Rafati, 2013).

Os vetores adenovirais exibem muitas das características desejadas num vetor ideal, como a transdução de células em divisão e quiescentes, grande capacidade de transporte, altos níveis de expressão transgénica e tropismo alargado (Vannucci et al., 2013). Estes factos ajudam a explicar o motivo destes vetores serem atualmente os mais

usados em ensaios clínicos (Ginn et al., 2013) e terem sido os primeiros em todo o Mundo a obter aprovação de uma agência governamental para tratamento em humanos (Peng, 2005). Contudo, apresentam duas grandes desvantagens: elevada imunogenicidade e imunidade pré-existente e expressão transitória do gene terapêutico (Kamimura et al., 2011).

A administração de adenovetores no organismo humano desencadeia uma resposta imunitária inata e adaptativa intensa (Vannucci et al., 2013), registando-se inclusivamente um caso fatal num ensaio clínico, em 1999 (Raper et al., 2003). Vários estudos serológicos indicam ainda que uma vasta maioria da população apresenta anticorpos contra os tipos de adenovírus nos quais os vetores actuais se baseiam. Esta resposta imunitária, apesar de desejável no contexto da vacinação génica e imunoterapia, condiciona a sua utilização noutras áreas pois reduz a duração da expressão do gene terapêutico, por eliminação do vetor e das células transduzidas, e impede a utilização futura de um adenovetor do mesmo tipo (Wold & Ison, 2013).

Para contornar esta imunogenicidade têm sido propostas múltiplas alternativas, como imunossupressão, vetores baseados em adenovírus não-humanos e modificação genética ou química da cápside viral. Estas modificações na cápside, que permitem igualmente modificar o tropismo do vector, têm-se focado nas fibras. A modificação genética das fibras substitui um tipo viral por outro alternativo, também denominado *seroswitch*, ao passo que a modificação química consiste no revestimento das fibras com polímeros, anticorpos e/ou outros péptidos. A descoberta recente de que o hexão tem um papel mediador no tropismo hepático dos adenovírus, levará a mais investigações e possíveis alterações neste componente da cápside viral (Mohit & Rafati, 2013).

A permanência do genoma viral em posição episomal no núcleo das células, e posterior diluição com a divisão celular, também contribui para uma expressão transgénica transitória. A integração no genoma é mínima, mesmo quando existe uma extensa homologia entre o vetor recombinante e o genoma do hospedeiro (Vannucci et al., 2013).

Os vetores adenovirais têm sido extensamente estudados para aplicação em várias patologias, nomeadamente na terapia génica do cancro. Recentemente têm sido desenvolvidos vetores adenovirais oncolíticos, capazes de replicação condicionada em células neoplásicas (Hemminki & Hemminki, 2014).

Na última década vetores baseados em vírus adeno-associados têm sido cada vez mais usados como veículos de entrega de genes para o tratamento de várias doenças humanas, estando atualmente representados em 4,9% dos ensaios clínicos (Ginn et al., 2013). Pertencentes à família *Parvoviridae*, género *Dependovirus*, os vírus adeno-associados (VAA) apresentam-se como vírus icosaédricos sem envelope, de 25 nm de diâmetro e genoma de ADN linear de cadeia simples, com 4-6 kb. São os vírus mais pequenos com genoma desoxiribonucleico e não se encontram associados a nenhuma doença em humanos (Berns & Parrish, 2013).

Até à data, doze serotipos de VAA (VAA1-12) foram descritos, embora mais de cento e dez sequências diferentes de cápsides tenham sido descobertas (Berns & Parrish, 2013). Estes diferentes serotipos, que divergem apenas na composição de aminoácidos das proteínas da cápside, mantendo-se a estrutura, tamanho e organização genética semelhantes, apresentam diferenças a nível do tropismo celular e tecidual e da sua neutralização serológica (Giacca, 2010).

A construção dos vetores adeno-associados baseia-se maioritariamente no genoma e cápside do VAA2, obtendo-se através da eliminação dos dois únicos genes virais, *rep* e *cap* (Kamimura et al., 2011). Embora este facto permita reduzir grandemente a sua imunogenicidade, estes vetores desencadeiam ainda assim uma resposta imunitária inata e adaptativa (Mingozzi & High, 2013) e é possível, inclusivamente, detetar anticorpos anti-VAA numa porção significativa da população (Jeune et al., 2013).

Os vírus adeno-associados necessitam de outro vírus (*helper virus*), geralmente um adenovírus ou mais raramente um vírus herpes simplex, para concluir o seu ciclo replicativo (Berns & Parrish, 2013). Na ausência deste *helper*, o genoma dos VAA tende a integrar-se num local específico do genoma do hospedeiro: a região 19q13.4, denominada AAVS1. Esta integração está dependente do gene *rep*, que não se encontra presente nos vetores adeno-associados. Assim, o genoma destes vetores permanece no núcleo na forma episomal, o que faz com que a expressão transgénica não esteja sujeita a metilação e consequente silenciamento, garantindo uma expressão mais prolongada. Embora com probabilidade reduzida a integração pode ocorrer, de forma aleatória, com vários estudos a concluir que esta ocorre com reduzida hipótese de oncogénese insercional (Li et al., 2011; Ward & Walsh, 2012).

Os vetores adeno-associados têm ganho cada vez mais popularidade na terapia génica e são considerados como um dos vetores de topo para o tratamento *in vivo* de várias doenças. Isto deve-se ao grande número de vantagens, próximas do vetor ideal, que estes apresentam, tais como: transdução de células em divisão e quiescentes, vírus parental não-patogénico, vasto tropismo celular, baixa imunogenicidade, possibilidade de integração específica no genoma hospedeiro e produção dos vetores em altas titulações. A principal limitação destes vetores prende-se com a sua reduzida capacidade de transporte (Vannucci et al., 2013). Outras limitações como demora no início da expressão transgénica (Vannucci et al., 2013) e imunidade pré-existente (Jeune et al., 2013) têm sido também descritas.

Alterações como imunossupressão, despiste pré-ensaio clínico de anticorpos anti-VAA, modificação genética e química da cápside viral, criação de bibliotecas de cápsides e plasmaferese têm sido propostas para ultrapassar a imunogenicidade e/ou modificar o tropismo destes vetores (Jeune et al., 2013; Mingozzi & High, 2013). O desenvolvimento de vetores auto-complementares (*self-complementary*) permite reduzir o tempo de iniciação da expressão transgénica, embora sejam acompanhados de uma redução severa (cerca de 50%) da capacidade de transporte, já de si pequena (Giacca, 2010). A respeito desta limitação, a pesquisa de vetores híbridos e duais tem procurado colmatar esta lacuna (Huang & Kamihira, 2013).

A família *Herpesviridae* é atualmente composta por 220 membros, dos quais apenas nove foram até à data identificados como tendo os humanos como hospedeiro primário: vírus herpes simplex (VHS) 1, vírus herpes simplex 2, citomegalovírus humano, vírus varicela-zoster, vírus Epstein-Barr e os herpesvírus humanos 6A, 6B, 7 e 8 (Roizman, Knipe, & Whitley, 2013). O crescente conhecimento sobre o VHS levou ao desenvolvimento de potenciais agentes terapêuticos e vetores para diversas aplicações em doenças humanas (Giacca, 2010).

Os vetores baseados em herpesvírus derivam essencialmente do VHS-1 (Vannucci et al., 2013). Constituído por quatro estruturas concêntricas (núcleo, cápside icosaédrica, tegumento e envelope lipídico), o seu genoma viral, presente no núcleo, é complexo e consiste numa dupla cadeia de ADN linear, com cerca de 150 kb (Roizman, Knipe, & Whitley, 2013). Este vírus é um conhecido agente patogénico humano, responsável por



lesões orofaciais e/ou, menos frequentemente, genitais, dolorosas ou não mas auto-limitadas no indivíduo imunocompetente (Arduino & Porter, 2008).

Podem ser distinguidos três tipos de vetores herpesvirais: vetores com capacidade replicativa, vetores não-replicativos e vetores *helper-dependent* ou *amplicons*. Os vetores com capacidade replicativa, também denominados oncolíticos, resultam da eliminação do fenótipo patogénico, preservando-se a capacidade de infeção lítica com virulência atenuada, sendo fundamentalmente desenvolvidos e aplicados no tratamento de várias neoplasias (Glorioso, 2014).

Apesar de o VHS-1 apresentar um genoma complexo, os seus genes são expressos numa cascata bem ordenada, na medida em que a ativação da expressão de certos genes depende da expressão de genes precedentes (Glorioso, 2014). Esta interdependência na expressão génica faz com que a deleção de um gene essencial torne o vírus incapaz de replicação. Várias gerações de vetores não-replicativos têm sido produzidas, com o intuito de reduzir a citotoxicidade em linhagens celulares extra-neuronais, sendo que a última geração, a quarta, apresenta a toxicidade mais reduzida mantendo em simultâneo uma robusta expressão transgénica (Goins et al., 2010).

Os *amplicons*, inicialmente desenvolvidos nos anos 80, são partículas virais idênticas aos viriões do VHS-1 nas quais o genoma é composto por um plasmídeo da bactéria *Escherichia coli* com apenas duas curtas sequências do genoma viral e a sequência transgénica de interesse (Giacca, 2010). Sendo que praticamente a totalidade do genoma viral se encontra ausente deste vetor garante-se uma grande capacidade de transporte, cerca de 150 kb, e bom perfil de segurança, com reduzida citotoxicidade e imunogenicidade (Vannucci et al., 2013). Contudo, ainda persistem dificuldades na produção destes vetores em altas concentrações (Glorioso, 2014).

O recurso a cromossomas artificiais bacterianos (*bacterial artificial chromosome* ou BAC) tem sido também proposto como método de produção de vetores herpesvirais (Goins et al., 2010).

Os vetores herpesvirais são considerados como bons vetores para terapia génica devido à sua grande capacidade de transporte (é o vetor viral com maior capacidade, entre 50 a 150 kb), neurotropismo natural mas transduzindo igualmente células em divisão e células quiescentes, não-integração no genoma do hospedeiro (permanecendo em

posição episomal), e pela possibilidade de ser quer um vetor oncolítico quer um vetor não-replicativo. Contudo, e à semelhança de todos os outros vetores virais, estes apresentam igualmente limitações, como imunogenicidade, citotoxicidade residual, expressão transgénica transitória e possibilidade de recombinação com outro vírus latente na célula. As duas primeiras limitações são, porém, consideradas positivas no caso dos vetores oncolíticos para o tratamento de neoplasias (Vannucci et al., 2013).

Apesar de a maioria da população (50-80%) ter uma resposta imunitária específica, activa e em altas concentrações, para o VHS, resultado da periódica reativação da infeção lítica viral, e de este vírus desencadear uma resposta imunitária inata e adaptativa, vários estudos efetuados não revelaram que estas tenham impacto na transdução (Goins et al., 2010).

O neurotropismo natural do HSV torna-o no vetor ideal e óbvio para o tratamento de doenças do sistema nervoso (Goins et al., 2010), estando atualmente presente em 3,1% dos ensaios clínicos (Ginn et al., 2013). No sistema nervoso periférico tem sido aplicado no tratamento de neuropatias e dor crónica (Goss, Krisky, Wechuck, & Wolfe, 2014), ao passo que no sistema nervoso central a sua aplicação tem-se focado no tratamento de neoplasias, essencialmente glioblastomas multiformes, onde quer vetores não-replicativos, expressando o gene HSV-TK e/ou outros agentes anti-tumorais, quer vetores oncolíticos têm sido estudados em ensaios pré-clínicos e clínicos (Assi et al., 2012). Os vetores herpesvirais são ainda aplicados em melanomas, carcinomas pavimentocelulares e neoplasias colorectais, hepáticas, pancreáticas e mamárias, bem como na transdução do tecido muscular, cardíaco e hepático e na vacinação génica (Giacca, 2010).

Outros herpesvírus humanos como o vírus Epstein-Barr, VHS-2 e HHV-6 têm sido também explorados como vetores (Glorioso, 2014).

Avaliando todos os vetores referidos até agora, torna-se evidente que apresentam muitas diferenças entre si, diferenças essas que podem ser sumariadas em capacidade de transporte (definida em kb), simplicidade de produção, eficiência de transdução, persistência da expressão transgénica e indução de efeitos adversos (Giacca, 2010). É a ponderação de todos estes elementos que leva à escolha de um determinado vetor para uma terapia génica específica (tabela 2 do anexo).

### **2.2.1.3. Outros Vetores Virais**

De forma a aumentar a segurança e eficácia terapêutica têm sido desenvolvidos vetores híbridos, isto é, vetores virais formados por elementos de dois vírus diferentes. Ao capitalizarem as vantagens de ambos os vírus, espera-se que estes vetores ultrapassem os vetores virais convencionais (Huang & Kamihira, 2013).

Outros vírus como o do sarampo, alfavírus, baculovírus, reovírus, vírus Sendai e o vírus vaccinia têm sido também modificados e estudados como vetores virais (Kamimura et al., 2011).

### **2.2.2. Vetores Não-Virais**

Apesar dos vetores virais serem ainda o método mais eficaz para a transferência do material genético para as células-alvo, os seus efeitos adversos, em particular a imunogenicidade e mutagénese insercional, têm fomentado o desenvolvimento de alternativas não-virais (Parhiz, Shier, & Ramezani, 2013). Esta área de investigação tem atraído grande atenção pelas vantagens que estes vetores podem oferecer em comparação com os vetores virais (Ibraheem et al., 2014), tais como: maior segurança, reduzida resposta imunitária, fácil preparação a baixo custo e em grandes quantidades, possibilidade de armazenamento durante longos períodos devido à sua estabilidade e capacidade de transporte livre de limitações. Contudo, a baixa eficiência apresentada na transfeção tem condicionado a sua aplicação (Pezzoli & Candiani, 2013; Ibraheem et al., 2014), estando presentes em apenas 24,2% dos ensaios clínicos (Ginn et al., 2013).

Para permitir a transferência do material genético e conduzi-lo à sua expressão, o vetor não-viral tem de ultrapassar uma série de obstáculos biológicos e não-biológicos (Parhiz et al., 2013) desde a biocompatibilidade, instabilidade extracelular, internalização celular, saída do endossoma e tráfego citoplasmático até à entrega no núcleo (Pezzoli & Candiani, 2013), obstáculos esses ultrapassados “naturalmente” pelos vírus, e correspondentes vetores, no seu processo de infeção. Embora a procura pelo vetor não-viral ideal, com todas as propriedades dos vírus mas sem as suas questões de segurança, ainda decorra, têm sido feitos progressos substanciais e vários vetores potenciais têm sido propostos (Parhiz et al., 2013).

O sistema mais simples de fornecimento de ácidos nucleicos por métodos não-virais é a aplicação direta no tecido-alvo de plasmídeos contendo o gene terapêutico, ou ADN *naked* (Pezzoli & Candiani, 2013). As características físicas e químicas da membrana plasmática previnem, no entanto, a passagem direta de macromoléculas grandes e com polaridade, como o ADN plasmídico. Em certos tipos celulares, como as fibras do músculo estriado, cardiomiócitos e células apresentadoras de antígeno, a internalização e libertação no citosol do material genético é mais facilitada, limitando-se assim a técnica a estes tecidos. Aplicada pela primeira vez no tecido muscular, a reduzida e transitória expressão transgénica do ADN plasmídico observada neste e em estudos subsequentes, comparando com outras formas não-virais, e a necessidade compensatória de aumento de dose e frequência de administração, levaram ao desenvolvimento de métodos físicos e químicos para a facilitação da entrada na célula (Giacca, 2010). Este método é, contudo, ainda o método não-viral mais usado em ensaios clínicos (Ginn et al., 2013).

A utilização de plasmídeos sem origem bacteriana, ou *minicircles*, e a introdução de transposões têm sido também alternativas estudadas para aumentar a eficácia e duração da expressão transgénica (Giacca, 2010).

#### **2.2.2.1. Métodos Físicos**

Estes métodos implicam a utilização de uma força física, de natureza variada, que fragiliza a membrana celular e, consequentemente, a torna mais permeável aos ácidos nucleicos (Ibraheem et al., 2014). Constituem métodos simples, que permitem readministração sem problemas e, ao contrário dos vetores virais e de alguns vetores não-virais químicos, não recorrem a substâncias citotóxicas ou imunogénicas e não apresentam limitação no tamanho do ácido nucleico a ser transportado (Villemejeane & Mir, 2009; Kamimura et al., 2011).

##### Injeção Balística de ADN

Este método físico, também denominado *gene gun*, consiste no bombardeamento de células ou tecidos com micropartículas revestidas de ADN, tendo sido aplicado pela primeira vez em 1987 em células vegetais. No início dos anos 90 maiores

desenvolvimentos e melhorias nesta técnica levaram à sua aplicação em células e tecidos de mamíferos (Villemejjane & Mir, 2009).

A aceleração por descarga gasosa de pequenas partículas (diâmetro 1-1,5  $\mu\text{m}$ ) de metais pesados biocompatíveis, como ouro ou tungsténio, revestidas com ADN plasmídico permite que estas atravessem a membrana e entreguem o material genético diretamente no núcleo (Uchida, Li, Mertens, & Alpar, 2009). Várias vantagens advêm deste facto como elevada expressão transgénica atingida rapidamente (3 horas), que permanece a longo prazo (28-50 dias), e possibilidade de tratamento de diversos órgãos sem o risco de lesar órgãos adjacentes (Ibraheem et al., 2014). Verifica-se, porém, uma reduzida eficiência na transfecção de tecidos inteiros e a necessidade de cirurgia para a sua utilização em tecidos profundos (Villemejjane & Mir, 2009).

Receios relacionados com as possíveis consequências da utilização e deposição de metais pesados no organismo humano têm fomentado a investigação de nanopartículas poliméricas biodegradáveis (Uchida et al., 2009).

A aplicação da transfecção balística limita-se fundamentalmente à pele para fins de vacinação génica, imunoterapia e terapia génica “suicida” para o tratamento de certas neoplasias (Ibraheem et al., 2014).

#### Injeção a Jacto (*Jet injection*)

Trata-se igualmente de um método balístico consistindo na injeção local a alta pressão de uma solução contendo o ácido nucleico, de forma a forçar a sua entrada nas células (Villemejjane & Mir, 2009; Giacca, 2010). A internalização das moléculas encontra-se diretamente relacionada com a pressão do jato pois este é responsável pela criação de orifícios de entrada na superfície da pele e membranas (Schramm-Baxter & Mitragotri, 2004).

Podem considerar-se dois tipos de injeção: alto volume ( $>100 \mu\text{L}$ ) e baixo volume (20-30  $\mu\text{L}$ ). Ambos, porém, usam a mesma concentração de ADN que pode variar entre 0,1 e 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de solução (Villemejjane & Mir, 2009). Este método físico apresenta maior capacidade de penetração que a injeção balística de ADN (Giacca, 2010) e a sua

combinação com a eletroporação parece aumentar a eficiência de transfeção (Horiki et al., 2004).

Apesar de ter outras numerosas aplicações clínicas, na terapia génica a injeção a jacto tem sido utilizada na transfeção da pele e de outros tecidos como o muscular, adiposo e mamário, para o tratamento de neoplasias, vacinação e doenças cutâneas de etiologia genética (Villemejeane & Mir, 2009).

### Injeção Intravascular Hidrodinâmica

Este método físico de transferência génica consiste na aplicação de uma pressão hidrodinâmica controlada em capilares para aumentar a internalização celular de ácidos nucleicos em circulação no sangue. O aumento de pressão provoca a separação das junções celulares endoteliais e a formação transitória de poros na membrana plasmática das células-alvo subjacentes ao endotélio, fenómenos denominados como hidroporação. Outros mecanismos alternativos de internalização têm sido propostos como a mediação por recetores ou macropinocitose (Suda & Liu, 2007).

Desde a sua primeira utilização, no final dos anos 90, que este método tem sido fundamentalmente aplicado com bastante sucesso na transfeção de hepatócitos de roedores, através de injeção na veia caudal, para estudos básicos e translacionais de várias doenças humanas (Bonamassa, Hai, & Liu, 2011). A sua aplicação noutros tecidos, noutras espécies animais, através de vias vasculares alternativas tem sido também explorada (Suda & Liu, 2007).

A utilização deste método em humanos parece ainda inexequível pois requer a injeção intravascular de altos volumes de solução a elevada velocidade, que acarretam em consequência perturbações hemodinâmicas e orgânicas. Apesar de transitórias, totalmente reversíveis e na generalidade bem toleradas nos modelos animais, estas poderão não ser seguras para o ser humano (Suda & Liu, 2007). O desenvolvimento de sistemas de injeção controlados por computador permite um maior controlo da pressão criada e possibilita o ajuste caso a caso, podendo assim representar o futuro da aplicação clínica em humanos deste método de transferência génica (Yokoo et al., 2013).

Contudo, a sua simplicidade, possibilidade de readministração, relativa segurança, toxicidade reduzida e, principalmente, elevada eficiência (uma das maiores registadas em métodos não-virais) tornam a injeção intravascular hidrodinâmica num método bastante desejável e promissor para a terapia génica (Suda & Liu, 2007; Bonamassa et al., 2011).

### Eletroporação

Mais corretamente denominada eletropermeabilização, este método consiste na introdução de moléculas nas células, através da membrana, pela exposição celular a impulsos elétricos (Shirley, Heller, & Heller, 2014).

A membrana citoplasmática separa o interior das células do ambiente circundante, ambos altamente condutores, impedindo a passagem de moléculas polares e de maior dimensão. A aplicação de um campo elétrico cria uma diferença de potencial na membrana que, por sua vez, induz nela alterações estruturais que levam à sua permeabilização (Shirley et al., 2014). Vários parâmetros físicos (duração do pulso, intensidade do campo e geometria dos eletrodos) e biológicos (tamanho, forma e densidade celular) influenciam o estabelecimento desta diferença de potencial (Villemejeane & Mir, 2009).

Iniciando-se em menos de uma dezena de microsegundos, a permeabilização permanece ao longo de vários minutos. Contudo, a presença prévia do ADN plasmídico é essencial, pois apesar de a membrana permanecer permeável esta molécula é incapaz de atravessar posteriormente à aplicação do campo elétrico (Gothelf & Gehl, 2012).

Esta destabilização induzida na membrana é totalmente reversível, garantindo-se a sobrevivência das células eletropermeabilizadas. No caso de o campo elétrico ser demasiado intenso ou de excessiva duração, estas alterações estruturais podem converter-se em definitivas e comprometer assim a viabilidade celular (Villemejeane & Mir, 2009). Atualmente é geralmente aceite que impulsos elétricos de curta duração (microsegundos) com força de campo elevada ( $>700$  V/cm) transferem o ADN com reduzidos efeitos adversos nas células (Shirley et al., 2014).

Aplicada pela primeira vez por Neumann et al. (1982), esta técnica é atualmente usada em vários tecidos como o músculo esquelético, pele, fígado e em neoplasias, entre outros (Villemeijane & Mir, 2009; Gothelf & Gehl, 2012). No domínio da Medicina Dentária, tem sido aplicada para a transfeção e diferenciação de células estaminais provenientes da polpa dentária (Rizk & Rabie, 2013).

A utilização mais frequente deste método não-viral, para além da transferência eletrogénica, consiste na eletrotransferência de agentes quimioterapêuticos para as células neoplásicas, ou eletroquimioterapia, que foi aprovada para uso clínico e encontra-se em aplicação nos Estados Unidos e em vários países europeus (Shirley et al., 2014).

Apesar de apresentar várias vantagens como segurança, localização precisa da transferência, curto espaço de tempo entre injeção e entrega e facilidade e baixo custo do procedimento, a sua aplicação *in vivo* apresenta ainda algumas limitações como o reduzido número de células transfetadas, necessidade de cirurgia para aplicação em órgãos internos e possibilidade de lise celular (Kamimura et al., 2011; Ibraheem et al., 2014).

### Sonoporação

A sonoporação consiste na aplicação de ultrassons para, através da permeabilização das membranas celulares, melhorar a internalização de moléculas de maior dimensão (Villemeijane & Mir, 2009).

As ondas ultrassónicas podem ser aplicadas por si só ou em combinação com microbolhas (*microbubbles*). Estas estruturas, que se encontram repletas de gás e são estabilizadas por um lípido, proteína ou polímero, permitem aumentar a permeabilização da membrana e consequentemente a eficiência da transfeção (Escoffre, Zeghimi, Novell, & Bouakaz, 2013).

O mecanismo de atuação da sonoporação é semelhante à eletropermeabilização na medida em que as ondas sonoras provocam igualmente uma diferença de potencial e consequente quebra transitória na integridade da membrana, facilitando assim a entrada de ADN plasmídico na célula. Contudo, apesar de várias propostas terem sido



apresentadas, não existe até hoje consenso em relação aos mecanismos celulares exactos que levam à transferência génica mediada por ultrassons (Delalande et al., 2013).

A sua aplicação *in vivo* tem sido explorada em diversos tecidos, focando-se naqueles que são mais facilmente acessíveis à ecografia diagnóstica como o músculo cardíaco e esquelético e tecidos neoplásicos, entre outros (Escoffre et al., 2013). A nível oral, este método físico tem sido estudado para a transfeção e diferenciação de células estaminais da polpa dentária em odontoblastos e consequente formação de dentina reparadora (Nakashima, Iohara & Zheng, 2006), transfeção de células dos tecidos periodontais (Sugano et al., 2014) e tratamento do cancro oral (Maeda et al., 2009).

Apesar de se tratar de um procedimento não-invasivo de baixo custo, simples, seguro e com o potencial de tratar tecidos internos (Escoffre et al., 2013), a extensão da transferência génica é difícil de padronizar e muito variável de acordo com diferentes condições experimentais (Giacca, 2010). Um maior conhecimento dos mecanismos celulares relacionados com a internalização do plasmídeo será essencial para o desenvolvimento e futura aplicação clínica da sonoporação (Delalande et al., 2013). Estudos demonstram que a combinação de um campo eléctrico com ondas ultrassónicas, ou eletrosonoporação, alcança uma maior eficiência de transfeção (Escoffre, Kaddur, Rols, & Bouakaz, 2010).

### Magnetofecção

Consiste na transferência génica através da aplicação de um campo magnético. A utilização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, revestidas por lípidos catiónicos ou polímeros e associadas a ADN plasmídico por interação eletroestática, permite a sua concentração nas células-alvo pela influência de um campo magnético externo. Apesar de apresentar várias vantagens significativas e de ter sido aplicada em múltiplos estudos em animais, este método físico ainda não é uma solução totalmente alternativa, sendo necessários mais estudos pré-clínicos (Plank, Zelphati, & Mykhaylyk, 2011).

### Fotoporação

Este método aplica um pulso laser como força física para gerar poros transitórios na membrana celular e assim permitir a internalização do material genético. Zeira et al (2003) descreveram pela primeira vez este tipo de transfeção no músculo de ratos, obtendo uma eficiência superior à simples injeção de ADN e comparável à da eletroporação. Apesar de vários desenvolvimentos e aplicações recentes deste método, mais estudos são necessários até que este procedimento se torne numa técnica prática para a transferência génica, quer *in vitro* quer *in vivo* (Kamimura et al., 2011).

#### **2.2.2.2. Métodos Químicos**

Ao contrário dos métodos físicos, que modificam as propriedades das membranas biológicas, os métodos químicos alteram as propriedades dos ácidos nucleicos de forma a facilitar a sua entrada nas células-alvo. Esta alteração resulta da associação com moléculas (lípidos, proteínas e/ou polímeros catiónicos), que permite reduzir a hidrofobicidade e neutralizar a carga elétrica dos ácidos nucleicos. Apesar dos grandes avanços alcançados nesta área ao longo das duas últimas décadas, a relativa segurança e simplicidade destes vetores não compensam a sua ainda insatisfatória eficiência (Giacca, 2010).

### Lipofecção

Consiste na transfeção das células-alvo através da combinação entre ADN e lipossomas ou lípidos catiónicos, também denominada lipoplexo. Apesar das suas vantagens e do seu extenso uso *in vitro* e *in vivo*, ainda permanecem muitas questões relativas à sua potencial citotoxicidade e ao seu mecanismo de internalização do ácido nucleico, bem como o papel que os lípidos catiónicos têm nesse processo (Kamimura et al., 2011; Ginn et al., 2013; Ibraheem et al., 2014).

### Polímeros Catiônicos

Os polímeros catiônicos, a pH fisiológico, são usados para condensar o ácido nucleico aniônico num complexo nanométrico, denominado poliplexo, mediante interações eletrostáticas. A redução de tamanho e a mudança na carga elétrica parecem ser os mecanismos através dos quais ocorre a passagem membranar do gene terapêutico para a célula de interesse (Ibraheem et al., 2014).

Um vasto número de polímeros tem sido estudado e usado como vetores para a transferência génica, desde proteínas naturais (gelatina e colagénio), polissacáridos (quitosano e ciclodextrinas) e polímeros sintéticos como dendrímeros catiônicos, poliésteres e polimetacrilatos (Parhiz et al., 2013). Infelizmente o recurso a poliplexos *in vivo* ainda não se encontra totalmente estabelecido devido à sua toxicidade, baixa eficiência, dispersão do polímero e falta de informação relativamente ao mecanismo exacto de transferência génica (Ibraheem et al., 2014).

### Péptidos

Os péptidos com curtas sequências de aminoácidos são facilmente produzidos e caracterizados, para além de não serem geralmente imunogénicos ou tóxicos. A baixa eficiência demonstrada pelos péptidos como método de transferência génica tem levado à sua combinação com outros métodos tais como sistemas lípido-péptido ou formulações polímero-péptido. Estes têm demonstrado eficácia no ultrapassar de certas barreiras apresentadas por outros métodos faltando, contudo, mais estudos para corroborar esta vantagem e levar à aplicação clínica este tipo de vetores (Parhiz et al., 2013).

#### **2.2.2.3. Métodos Biológicos**

À semelhança dos vírus, também bactérias, bacteriófagos e fungos têm sido explorados como veículos de transferência génica. Usados fundamentalmente para o tratamento de neoplasias (Mohit & Rafati, 2013), encontram-se actualmente presentes em 27 ensaios clínicos (Ginn et al., 2013).

### **2.3. Aplicações na Medicina Dentária**

No início, a terapia génica foi inspirada e concebida para o tratamento de doenças genéticas monogénicas e foram sobre estas que não só se debruçaram os primeiros ensaios clínicos em humanos, como também os mais recentes sucessos alcançados nesta área. Atualmente a terapia génica é estudada para o tratamento de múltiplas doenças (tabela 3 do anexo) desde neoplasias, doenças cardiovasculares, doenças infecciosas (onde se destaca o VIH/SIDA), doenças neurológicas, doenças oftalmológicas, doenças inflamatórias, entre outras (Ginn et al., 2013).

Baum & O'Connell (1995) escrevem pela primeira vez sobre a possível aplicação da terapia génica na medicina dentária, referindo o tratamento do cancro oral e a transfeção de queratinócitos da mucosa oral e de células das glândulas salivares. Desde então que praticamente todos os tecidos da cavidade oral e um largo espectro de patologias orais foram alvo de transferência génica. Nenhuma aplicação oral da terapia génica se encontra pronta para uso clínico rotineiro em humanos, apesar de provado o seu sucesso em estudos animais e de recente evidência de utilidade em ensaios clínicos humanos (Baum, 2014).

#### **2.3.1. Tratamento do Cancro Oral**

O cancro oral é o sexto cancro mais prevalente em todo o Mundo. Em Portugal, entre 1998 e 2007, foram diagnosticados 9623 casos e neste mesmo período observou-se um aumento na sua incidência, à exceção do cancro labial (Monteiro et al., 2013). Apesar de muitos esforços para a investigação e desenvolvimento de novas terapias para esta neoplasia a sobrevivência a cinco anos não melhorou, permanecendo uma das mais baixas (Ayllón Barbellido et al., 2008).

O crescente conhecimento sobre a biologia do cancro oral e o papel dos genes na sua oncogénese permitiram estabelecer possíveis alvos terapêuticos (Ayllón Barbellido et al., 2008). De facto, o foco inicial da terapia génica na região oral foi para o tratamento do carcinoma pavimento celular, tendo o primeiro ensaio clínico decorrido há cerca de duas décadas (Baum, 2014).

De uma forma geral podem considerar-se duas abordagens para o tratamento do cancro através da terapia génica: tornar as células neoplásicas como alvo, inibindo a sua

proliferação, transferindo genes suicidas ou eliminando-as através de vírus oncolíticos, ou melhorar a eficácia do sistema imunitário em reconhecer e destruir estas células, também denominada imunoterapia (Giacca, 2010). Particularmente para o cancro oral, diversas estratégias têm sido abordadas, tais como: adição génica, vetores oncolíticos, terapia génica “suicida”, inibição da angiogénese tumoral, imunoterapia, excisão génica e ARN *antisense*. A adição génica e os vetores oncolíticos parecem ser as abordagens mais promissoras (Ayllón Barbellido et al., 2008).

Em 2003 a República Popular da China aprovou um adenovírus serotipo 5 não-replicativo, contendo o gene do p53 (Gendicine™), para uso clínico em humanos no tratamento do carcinoma espinocelular da cabeça e do pescoço. Mais tarde, em 2005, aprova também, para a mesma neoplasia, a utilização de um adenovírus oncolítico, condicionalmente replicativo (Oncorine™), em combinação com a quimioterapia (Wirth et al., 2013). O facto de existirem algumas dúvidas em relação à qualidade dos ensaios clínicos executados e de não existir evidência científica publicada nos últimos cinco anos sobre o uso continuado do Gendicine™ faz com que estas terapias ainda não tenham sido aprovadas por nenhuma agência governamental europeia ou norte-americana (Ledley et al., 2014). Contudo, um adenovírus oncolítico semelhante ao Oncorine™, denominado ONYX-015, tem sido sujeito a vários ensaios de fase I e II para o tratamento do cancro oral e de outras neoplasias apresentando resultados promissores (Hemminki & Hemminki, 2014).

Para uma futura aplicação da terapia génica no tratamento do cancro oral será necessário uma otimização dos vetores e da eficácia de transfeção (Ayllón Barbellido et al., 2008; Baum, 2014).

### **2.3.2. Glândulas Salivares**

Uma das aplicações mais relevantes e promissoras da terapia génica em medicina dentária tem como alvo as glândulas salivares. Podem distinguir-se duas grandes áreas de aplicação: prevenção e reparação da hipofunção salivar e xerostomia pós-radioterapia e produção nas glândulas salivares de proteínas terapêuticas para ação local ou sistémica (Baum, 2014).

### **2.3.2.1. Prevenção e Reparação da Hipofunção Salivar e Xerostomia Pós-Radioterapia**

A saliva é um elemento muito importante para a manutenção da saúde oral e das funções do trato gastrointestinal superior (Jensen et al., 2010). As glândulas salivares, produtoras de saliva, são constituídas por dois tipos celulares: as células acinares e as células ductais. As células acinares, permeáveis à água, excretam cloreto de sódio formando a saliva primária isotónica ao passo que as células ductais, impermeáveis à água, reabsorvem parte desse cloreto de sódio, originando assim a saliva final hipotónica (Samuni & Baum, 2011).

É atualmente consensual na literatura que a hipofunção salivar e a xerostomia são efeitos adversos muito frequentes do tratamento do cancro oral, em particular da radioterapia, embora a sua verdadeira prevalência e fisiopatologia não se encontrem ainda determinadas (Jensen et al., 2010). Vários autores consideram que a maioria das células lesadas são acinares, sobrevivendo principalmente células ductais (Baum et al., 2010). Estes efeitos adversos têm um impacto muito significativo na qualidade de vida dos pacientes oncológicos, levando a um aumento do risco de infeções orais, lesões de cárie, dor orofacial, entre outras alterações físicas e psicológicas (Plemons, Al-Hashimi & Marek, 2014).

Apesar de existirem atualmente técnicas de radioterapia que reduzem o impacto sobre as glândulas salivares, como a radioterapia de intensidade modulada ou a radioterapia conformacional tridimensional, ambas provocam ainda assim hipofunção salivar e xerostomia, ainda que numa incidência inferior à da radioterapia convencional (Jensen et al., 2010). Não obstante a existência de uma variedade de agentes terapêuticos para o tratamento destes efeitos adversos, como a pilocarpina, lubrificantes e substitutos salivares, o seu tratamento é raramente eficaz (Sasportas et al., 2013; Plemons, Al-Hashimi & Marek, 2014).

Pelo facto de não haver uma terapia convencional para o tratamento da hipofunção salivar, diversos autores começaram a olhar para a terapia génica como uma possível solução para esta patologia. As glândulas salivares são um órgão-alvo com muitas vantagens para a terapia génica (Samuni & Baum, 2011), tais como:

- Fácil acesso do vetor às células epiteliais através da canulação dos canais excretores das glândulas, um procedimento minimamente invasivo e rotineiramente praticado durante as sialografias;
- Volume de fluido passível de infusão em cada glândula encontra-se definido (0,5-1,5 mL - determinado exatamente para cada glândula e paciente);
- Ausência de diluição após infusão;
- Divisão lenta das células epiteliais permite ter uma população estável perante vetores não-integrantes;
- Produção de níveis significativos de proteínas transgênicas pelas células epiteliais salivares quer para exportação exócrina quer para exportação endócrina;
- Minimização do risco de expansão dos vetores para além dos limites das glândulas por estas serem capsuladas;
- Na presença de efeitos adversos potencialmente fatais, as glândulas salivares não são indispensáveis à vida humana e poderão ser removidas;

Após a descoberta das aquaporinas (canais que facilitam o movimento transmembranar de água em resposta a um gradiente osmótico) e do isolamento do ADN complementar da aquaporina-1 (hAQP1), uma equipa de investigadores norte-americanos colocou a hipótese de a transferência génica da hAQP1 nas células ductais, mediada por um adenovetor serotipo 5, aumentar a secreção de saliva, pela indução da permeabilização nestas células (Samuni & Baum, 2011). Vários estudos *in vitro* e *in vivo*, em diversos modelos animais como o rato, porco ou macaco rhesus, e um extenso estudo de toxicologia e biodistribuição demonstraram a segurança e eficácia desta terapia. Estes resultados impulsionaram a realização de um ensaio clínico em humanos, iniciado em 2008 (Baum et al., 2010; Samuni & Baum, 2011).

Os resultados do ensaio clínico demonstram que de 11 indivíduos seis apresentaram um aumento do fluxo salivar e, destes seis, cinco referiam uma melhoria nas queixas subjetivas. O motivo mais comum para a falta de eficácia nos restantes indivíduos relaciona-se com a resposta imunitária apresentada contra o vetor. Todos os efeitos adversos ocorridos foram classificados como leves ou moderados sendo que a vasta

maioria (> 75%) foi classificada como não relacionada com a terapia. No mesmo sentido não foram encontradas alterações em nenhum dos parâmetros hematológicos e químicos avaliados no decurso do ensaio. Pode assim concluir-se que esta abordagem para o tratamento da hipofunção salivar é segura e resulta em significativas melhorias objetivas e subjetivas (Baum et al., 2012).

Um follow-up a longo prazo destes 11 indivíduos está em curso para determinar a duração máxima destas melhorias e recolher mais informação sobre biosegurança. Paralelamente, um segundo ensaio clínico em humanos com um vetor viral menos imunogénico (AAV2), e em consequência de expressão transgénica mais prolongada, está a ser planeado (Baum, 2014).

Para além do tratamento da hipofunção salivar e xerostomia, a aplicação da terapia génica também se tem focado na sua prevenção através da transferência de genes codificadores do fator de crescimento dos queratinócitos (Zheng et al., 2011) ou da cinase tipo TGF- $\beta$  1B (Timiri Shanmugam et al., 2013). Apesar de ainda limitadas a estudos animais, estas abordagens apresentam resultados encorajadores.

#### **2.3.2.2. Produção de Proteínas Terapêuticas para Ação Local ou Sistémica**

Apesar das glândulas salivares terem primariamente uma secreção exócrina está igualmente descrita uma via endócrina (sanguínea). O segundo foco da aplicação da terapia génica nas glândulas salivares baseia-se nesta dupla secreção e consiste na transformação destas glândulas em “bioreatores endógenos” para a produção de proteínas com fim terapêutico na cavidade oral e trato gastrointestinal superior (ação local através da secreção exócrina) ou a nível sistémico, através da via endócrina (Perez et al., 2010; Samuni & Baum, 2011).

Múltiplas aplicações endócrinas têm sido sugeridas como o tratamento da deficiência de hormona de crescimento, hipoparatiroidismo (hormona paratiroideia), anemia crónica (eritropoietina), doença de Fabry ( $\alpha$ -galactosidase), diabetes mellitus tipo 1 (proinsulina B10) e tipo 2 (péptido 1 tipo-glucagon) e deficiência em  $\alpha$ -1-antitripsina. Para ação local tem sido estudada a transdução do gene da histatina 3 para o tratamento das candidíases resistentes aos derivados azólicos e do fator de crescimento dos



queratinócitos para a prevenção da mucosite induzida pela radioterapia (Perez et al., 2010; Baum, 2014).

Estes estudos têm sido conduzidos em diversas espécies animais embora não tenha sido feito nenhum ensaio clínico em humanos. A razão principal para este facto relaciona-se com a falta de conhecimento sobre os mecanismos moleculares e celulares através dos quais é determinada a via pela qual uma proteína de secreção segue. Isto tem sido evidente em certos estudos animais nos quais se observa que uma proteína destinada para secreção endócrina acaba por ser maioritariamente excretada pela saliva (Perez et al., 2010). Enquanto estes mecanismos não forem totalmente compreendidos é improvável que ensaios clínicos em humanos venham a ser aprovados para estas aplicações num futuro próximo (Baum, 2014).

### **2.3.3. Regeneração Tecidual Maxilofacial**

Estima-se que mais de 85% da população mundial necessita de reparação ou substituição de uma estrutura maxilofacial, incluindo osso, dentes, articulação temporo-mandibular, entre outras. Contudo, a regeneração destes tecidos é um desafio pela complexidade da interação entre a ciência básica e engenharia de tecidos e a sua translação clínica. A terapia génica é uma ferramenta única que pode aumentar significativamente o progresso no sentido de uma regeneração craniofacial clínica (Scheller, Villa-Diaz & Krebsbach, 2012).

#### **2.3.3.1. Periodonto**

O termo “regeneração” pode ser definido como a reconstrução de tecidos perdidos ou lesados de forma a restaurar totalmente a sua estrutura e funções originais. O tratamento periodontal regenerativo utiliza técnicas específicas para restaurar as estruturas de suporte do dente (ligamento periodontal, osso alveolar e cimento radicular) e a sua função, perdidas como resultado da periodontite ou trauma (Ramseier, Rasperini, Batia & Giannobile, 2012).

Atualmente existe uma grande diversidade de soluções para a regeneração periodontal como o enxerto autógeno, enxerto alógeno, xenoenxerto, membranas reabsorvíveis e não-reabsorvíveis e fatores de crescimento. Os fatores de crescimento têm ganho maior

destaque nos últimos anos, em particular as proteínas derivadas da matriz do esmalte e as proteínas ósseas morfogenéticas (Ramseier et al., 2012).

Apesar dos resultados encorajadores de diversos estudos sobre regeneração periodontal usando fatores de crescimento recombinantes, existem limitações tais como atividade biológica transitória (tempo de semi-vida curto), inativação por proteases, baixa biodisponibilidade por parte dos veículos de entrega existentes, reduzida retenção no local e custos consideráveis. Para além destas limitações, nenhuma técnica disponível atualmente tenta mimetizar os acontecimentos que ocorrem no processo natural de osteogénese, onde múltiplos fatores regenerativos interagem numa sequência temporal e espacial definida (Ramseier et al., 2012; Scheller et al., 2012).

A terapia génica apresenta vantagens únicas em relação às técnicas de regeneração periodontal convencionais: maior tempo de semi-vida e duração da atividade biológica através da expressão transgénica contínua dos fatores pelas células transduzidas e possibilidade de controlo da quantidade, distribuição temporal e distribuição espacial (quando associado a matrizes) de múltiplos fatores regenerativos de forma mais próxima ao fenómeno osteogénico natural (Rios, Lin, Oh, Park, & Giannobile, 2011).

Diversas células do tecido ósseo têm sido transduzidas/transfectadas para o estudo da terapia génica regenerativa. Os vetores mais utilizados têm sido os virais, em particular os adenovirais, adeno-associados, retrovirais e lentivirais (Fischer et al., 2011), embora os vetores não-virais tenham sido também explorados (Sugano et al., 2014). Apesar da abordagem *in vivo* ser a preferida por ser mais simples, prática, minimamente invasiva e pouco dispendiosa, a *ex vivo* é atualmente a mais usada nos estudos, pela sua maior segurança e controlo (Fischer et al., 2011; Rios et al., 2011). O tipo de defeito ósseo tem de ser igualmente tomado em consideração pois influencia a capacidade de retenção dos vetores, podendo ser necessárias matrizes. Para uma orientação tridimensional da regeneração deve recorrer-se a uma matriz de porosidade variável que permita o crescimento de certas células em detrimento de outras (Rios et al., 2011).

Podem considerar-se duas estratégias na utilização da terapia génica para a regeneração periodontal:

- Expressão transgênica de apenas um fator regenerativo;

Um grande número de genes está envolvido nos múltiplos passos da osteogênese e são, assim, candidatos potenciais para a terapia gênica. Os mais utilizados são os genes do fator de crescimento derivado das plaquetas e das proteínas ósseas morfogenéticas (POM). As POM-2, -4 e -7, e mais recentemente as POM-6 e -9, são as preferidas por terem uma grande capacidade de indução da osteogênese (Fischer et al., 2011; Rios et al., 2011; Ramseier et al., 2012).

- Expressão transgênica de combinações de genes para ação sinérgica;

Não obstante a maioria dos estudos focar-se exclusivamente na utilização de um único fator regenerativo, esta estratégia não explora o verdadeiro potencial da terapia gênica em mimetizar os fenômenos da osteogênese natural. A descoberta que a expressão combinada de diferentes fatores conduz a um efeito sinérgico com maior diferenciação celular e osteogênese tem fomentado o seguimento desta alternativa. As conjugações mais frequentes baseiam-se na combinação de POMs com outros fatores, como outras POMs (-2 e -7 ou -4 e -7), fatores angiogênicos (fator de crescimento do endotélio vascular) e fatores de transcrição osteogênicos como o Runx2, por exemplo (Fischer et al., 2011). A inclusão de indutores como a dexametasona, doxíciclina ou rapamicina permite controlar a duração e a sequência temporal da expressão transgênica dos fatores regenerativos (Scheller et al., 2012).

Apesar de se terem alcançado resultados promissores em modelos animais, ainda não existem ensaios clínicos humanos efetuados. Outras aplicações, mais restritas à regeneração óssea, poderão passar pelo aumento da quantidade de osso disponível no rebordo alveolar e/ou elevação do seio maxilar para a colocação de implantes (Fischer et al., 2011).

A regeneração tecidual periodontal por si só não é a única resposta para garantir previsivelmente um tratamento estável a longo prazo de pacientes com um historial de doença periodontal. Sabe-se atualmente que a resposta do hospedeiro contra as bactérias periodonto-patogênicas, através de metaloproteinases, catepsinas e outros mediadores inflamatórios, é o fator principal para a destruição do tecido periodontal. Através da terapia gênica diversos investigadores têm procurado modular a resposta do hospedeiro de forma a evitar a progressão da periodontite. Cirelli et al (2009) recorreram ao gene da

imunoglobulina Fc anti-recetor do fator de necrose tumoral, através de um vetor viral adeno-associado, num modelo experimental de periodontite. Os níveis terapêuticos de expressão transgénica da proteína mantiveram-se durante mais de três meses e o volume e densidade de perda óssea foram inibidos após a administração. Patil et al (2008) demonstraram que uma sobreexpressão de tristetraprolina, uma proteína reguladora das citocinas, induzida através de um vetor adenoviral, reduz significativamente *in vitro* a expressão da interleucina-6, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e prostaglandina E2, reduzindo a perda óssea induzida por inflamação e o infiltrado inflamatório. Mais recentemente, Yu et al (2011) demonstraram o potencial da proteína cinase fosfatase 1 em prevenir a perda de osso alveolar *in vivo*. Estes resultados sugerem a possível aplicação da terapia génica na modulação da progressão da doença periodontal (Rios et al., 2011; Ramseier et al., 2012).

#### **2.3.3.2. Articulação Temporo-Mandibular (ATM)**

A regeneração da ATM implica a criação de osso e cartilagem funcionais com uma zona de transição apropriada. Esta tem sido tentada através de um enxerto osteocondral, constituído por condrócitos diferenciados e fibroblastos gengivais transduzidos com POM-7 numa matriz pré-fabricada. Paralelamente, a reparação desta estrutura tem sido estudada em modelos animais (ratos) com a injeção no tecido condilar de um vetor viral adeno-associado contendo o gene do fator de crescimento do endotélio vascular. Uma maior exploração e melhoria destas técnicas poderão colocar a reparação ou regeneração da ATM nos limites da terapia génica (Scheller et al., 2012).

#### **2.3.3.3. Complexo Pulpo-Dentinário**

O dente é composto por diferentes tipos de tecido mineralizado, com diferentes processos formativos e capacidades regenerativas. O cimento radicular regenera naturalmente ao longo de toda a vida ao contrário do esmalte cuja regeneração não é possível após a erupção pois as suas células progenitoras (ameloblastos) sofrem apoptose durante a formação da matriz de esmalte (Malhotra & Mala, 2012).

Ao longo da vida a dentina, com o auxílio da polpa dentária, tem a capacidade de se regenerar perante estímulos nocivos formando dentina terciária. Esta dentina é

subclassificada em reacionária ou reparativa consoante seja formada por odontoblastos primários ou, em casos de maior destruição, por odontoblastos recém-diferenciados a partir de células pulpares progenitoras, respetivamente (Simon et al., 2011).

A regeneração do complexo pulpo-dentinário, também denominada regeneração endodôntica, tem sido desenvolvida ao longo dos últimos anos. Para mimetizar este fenómeno através de engenharia de tecidos, existem diversas alternativas baseadas em três elementos: células estaminais, fatores de crescimento e matrizes (Simon et al., 2011; Malhotra & Mala, 2012).

A terapia génica tem procurado a transdução das células pulpares com genes de proteínas ósseas morfogenéticas para induzir a dentinogénese. Em casos de extensa pulpíte ou necrose pulpar, nos quais a quantidade de células pulpares vitais é muito reduzida ou nula, uma abordagem *ex vivo* é preferível (Nakashima et al., 2006). Apesar de alguns resultados positivos a literatura é muito escassa em relação ao uso da terapia génica nesta aplicação (Malhotra & Mala, 2012).

A bioengenharia de um dente completo é substancialmente mais complexa e as estratégias têm-se baseado no uso de células estaminais derivadas da polpa dentária, ligamento periodontal e/ou gérmen dentário, associadas a matrizes, com muito pouco ênfase na terapia génica (Scheller et al, 2012).

#### **2.3.4. Tratamento da Dor Orofacial**

A dor orofacial é muito prevalente e tem um grande impacto na qualidade de vida dos doentes. Dentro das suas principais causas não-dentárias destacam-se as disfunções temporo-mandibulares e a nevralgia do trigémeo. O tratamento da dor orofacial é multidisciplinar e inclui terapêuticas não-farmacológicas e farmacológicas, que para além de onerosas e limitadas nem sempre são eficazes (Romero-Reyes & Uyanik, 2014).

A terapia génica representa uma nova abordagem no tratamento da dor crónica que ultrapassa as limitações das terapêuticas convencionais. Ambos os vetores, não-virais e virais, têm sido utilizados em modelos animais embora os vetores baseados no vírus herpes simplex sejam largamente os preferidos, pelo seu neurotropismo natural, grande capacidade de transporte, eficiente transdução das células-alvo e persistência no genoma

do hospedeiro na forma episomal extra-cromossómica, garantindo uma expressão transgénica prolongada (Goins, Cohen & Glorioso, 2012; Goss et al., 2014).

Os genes transduzidos podem ser divididos em opióides e não-opióides. Dentro dos opióides destacam-se a encefalina,  $\beta$ -endorfina, endomorfina e o receptor opióide  $\mu$ . Os genes não-opióides são muito diversos podendo ser classificados em cinco grupos: neurotrofinas, neurotransmissores, moduladores imunitários, agentes *anti-sense* e outros (Goins et al., 2012).

A aplicação da terapia génica no tratamento da dor crónica orofacial encontra-se ainda limitada a estudos animais. Vit et al. (2009) demonstraram que a administração no gânglio trigeminal de ratos de um vetor adenoviral contendo o gene da descarboxilase do ácido glutâmico induz a síntese de GABA por parte das células gliais satélite, provocando analgesia orofacial. Mais recentemente Tzabazis et al. (2014) concluíram que uma única injeção no gânglio trigeminal (de ratos) de vectores baseados no vírus herpes simplex tipo 1, codificando o gene da preproencefalina humana, induz um efeito analgésico que dura até 8 semanas. Ambos os estudos concluem também que se trata de uma técnica segura (Vit et al., 2009; Tzabazis et al., 2014).

Os resultados do primeiro ensaio clínico em humanos, e único (até à data), sobre a aplicação da terapia génica no tratamento da dor oncológica concluem que esta é segura e eficaz. No grupo exposto à maior concentração de vetor, os indivíduos reportaram uma diminuição de dor, numa escala analgésica numérica de 0 a 10, de 8 para 1 nas primeiras duas semanas, atingindo no máximo o valor 2 num período de quatro meses (Fink et al., 2011).

A terapia génica, por si só ou em combinação com as terapêuticas convencionais farmacológicas e não-farmacológicas, poderá ser uma solução para o tratamento da dor orofacial crónica num futuro relativamente próximo (Goins et al., 2012).

### **2.3.5. Outras Aplicações**

Outras aplicações como vacinas de ADN para a cárie dentária (Russell, 2008), aceleração do movimento ortodôntico e inibição da reabsorção radicular externa induzida pelo movimento ortodôntico têm sido também teorizadas e exploradas em modelos animais (Baum, 2014).





### 3. Conclusão

A terapia génica pode ser definida como a inserção de um gene funcional em certas células para corrigir uma disfunção celular ou para induzir uma nova função celular.

Apesar de terem de se considerar diversas estratégias, células-alvo e ácidos nucleicos terapêuticos, a transferência génica é a parte mais importante desta terapia. De facto, tornar esta transferência mais eficaz representa ainda o desafio mais relevante para o sucesso clínico da terapia génica. Existem dois grandes grupos de vetores: os virais e os não-virais. Apesar dos vetores não-virais serem os métodos mais seguros, os vetores baseados em vírus são ainda a abordagem mais frequente por serem a que garante maior eficácia na entrega do material genético terapêutico nas células-alvo. A escolha do vetor viral depende da ponderação de vários elementos como a capacidade de transporte, simplicidade de produção, eficiência de transdução, persistência da expressão transgénica e indução de efeitos adversos.

Apesar de um começo atribulado, fruto da ânsia em obter o potencial prometido pela terapia génica, com os mais de 1800 ensaios clínicos executados até à data, que demonstram a sua segurança e eficácia, e a recente e inédita aprovação pela União Europeia de um produto de terapia génica para o tratamento da deficiência familiar em lipase lipoproteica (Glybera®), podemos atualmente afirmar que esta passou definitivamente do domínio ficcional para a realidade. A terapia génica tem sido explorada para o tratamento de múltiplas patologias genéticas monogénicas, oncológicas, cardiovasculares, infecciosas, neurológicas, oftalmológicas, entre outras. Também na região maxilofacial tem sido estudada fundamentalmente para o tratamento do cancro oral, da hipofunção salivar e xerostomia pós-radioterapia, da dor orofacial e para a regeneração tecidular. Outras aplicações nesta região têm sido igualmente teorizadas e estudadas em modelos animais.

De acordo com os resultados obtidos sobre estas aplicações em diversos estudos animais e de ensaios clínicos humanos, podemos concluir que esta abordagem é segura e eficaz. Assim, e apesar de faltar um longo caminho, a terapia génica poderá, num futuro próximo, fazer parte do arsenal terapêutico do médico-dentista.



#### 4. Bibliografia

Arduino, P., & Porter, S. (Fevereiro de 2008). Herpes Simplex Virus Type I infection: overview on relevant clinico-pathological features. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, pp. 107-121.

Assi, H., Candolfi, M., Baker, G., Mineharu, Y., Lowenstein, P., & Castro, M. (11 de Outubro de 2012). Gene therapy for brain tumors: Basic developments and clinical implementation. *Neuroscience Letters*, pp. 71-77.

Ayllón Barbellido, S., Campo Trapero, J., Cano Sánchez, J., Perea García, M. A., Escudero Castaño, N., & Bascones Martínez, A. (1 de Janeiro de 2008). Gene therapy in the management of oral cancer: Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, pp. E15-21.

Baum, B., Alevizos, I., Zheng, C., Cotrim, A., Liu, S., McCullagh, L., . . . Illei, G. (20 de Novembro de 2012). Early responses to adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA for radiation-induced salivary hypofunction. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 19403-19407.

Baum, B. (Março de 2014). Gene therapy. *Oral Diseases*, pp. 115-118.

Baum, B., & O'Connell, B. (Fevereiro de 1995). The Impact of Gene Therapy on Dentistry. *The Journal of the American Dental Association*, pp. 179-189.

Baum, B., Zheng, C., Alevizos, I., Cotrim, A., Liu, S., McCullagh, L., . . . Illei, G. (Janeiro de 2010). Development of a gene transfer-based treatment for radiation-induced salivary hypofunction. *Oral Oncology*, pp. 4-8.

Berns, K. I., & Parrish, C. R. (2013). Parvoviridae. In D. M. Knipe, & P. Howley, *Fields Virology* (pp. 1768-1791). Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins.

Biasco, L., Baricordi, C., & Aiuti, A. (Abril de 2012). Retroviral Integrations in Gene Therapy Trials. *Molecular Therapy*, pp. 709-716.

Biffi, A., Bartholomae, C. C., Cesana, D., Cartier, N., Aubourg, P., Ranzani, M., . . . Montini, E. (19 de Maio de 2011). Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign bias and not oncogenic selection. *Blood*, pp. 5332-5339.

Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., . . . Anderson, W. F. (20 de Outubro de 1995). T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA-SCID: Initial Trial Results After 4 Years. *Science*, pp. 475-480.

Bonamassa, B., Hai, L., & Liu, D. (Abril de 2011). Hydrodynamic Gene Delivery and Its Applications in Pharmaceutical Research. *Pharmaceutical Research*, pp. 694-701.

Bouard, D., Alazard-Dany, N., & Cosset, F.-L. (Maio de 2009). Viral vectors: from virology to transgene expression. *British Journal of Pharmacology*, pp. 153-165.

Bryant, L. M., Christopher, D. M., Giles, A. R., Hinderer, C., Rodriguez, J. L., Smith, J. B., . . . Wilson, J. M. (Junho de 2013). Lessons Learned from the Clinical Development and Market Authorization of Glybera. *Human Gene Therapy Clinical Development*, pp. 55-64.

Collet, G., Grillon, C., Nadim, M., & Kieda, C. (10 de Agosto de 2013). Trojan horse at cellular level for tumor gene therapies. *Gene*, pp. 208-216.

Deakin, C. T., Alexander, I. E., & Kerridge, I. (Novembro de 2009). Accepting Risk in Clinical Research: Is the Gene Therapy Field Becoming Too Risk-averse? *Molecular Therapy*, pp. 1842-1848.

Delalande, A., Kotopoulis, S., Postema, M., Midoux, P., & Pichon, C. (10 de Agosto de 2013). Sonoporation: Mechanistic insights and ongoing challenges for gene transfer. *Gene*, pp. 191-199.

Escoffre, J., Kaddur, K., Rols, M., & Bouakaz, A. (Outubro de 2010). In Vitro Gene Transfer by Electrosonoporation. *Ultrasound in Medicine & Biology*, pp. 1746-1755.

Escoffre, J.-M., Zeghimi, A., Novell, A., & Bouakaz, A. (Fevereiro de 2013). In-Vivo Gene Delivery by Sonoporation: Recent Progress and Prospects. *Current Gene Therapy*, pp. 2-14.

Escors, D., & Breckpot, K. (Abril de 2010). Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, pp. 107-119.

- Escors, D., & Breckpot, K. (2012). Introduction to Gene Therapy. In D. Escors, K. Breckpot, F. Arce, G. Kochan, & H. Stephenson, *Lentiviral Vectors and Gene Therapy* (pp. 1-10). Heidelberg: Springer.
- Evans, C. H., Ghivizzani, S. C., & Robbins, P. D. (27 de Maio de 2008). Arthritis gene therapy's first death. *Arthritis Research & Therapy*, pp. 1-9.
- Fink, D., Wechuck, J., Mata, M., Glorioso, J., Goss, J., Krisky, D., & Wolfe, D. (Agosto de 2011). Gene Therapy for Pain: Results of a Phase I Clinical Trial. *Annals of Neurology*, pp. 207-212.
- Fischer, J., Kolk, A., Wolfart, S., Pautke, C., Warnke, P., Plank, C., & Smeets, R. (Janeiro de 2011). Future of local bone regeneration - Protein versus gene therapy. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, pp. 54-64.
- Fletcher, J. C., & Anderson, W. F. (27 de Novembro de 1980). Gene Therapy in Human Beings: When Is It Ethical to Begin? *The New England Journal of Medicine*, pp. 1293-1297.
- Gaudet, D., de Wal, J., Tremblay, K., Déry, S., van Deventer, S., Freidig, A., . . . Méthot, J. (Junho de 2010). Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Atherosclerosis Supplements*, pp. 55-60.
- Giacca, M. (2010). *Gene Therapy*. Milão: Springer.
- Ginn, S. L., Alexander, I. E., Edelstein, M. L., Abedi, M. R., & Wixon, J. (Fevereiro de 2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *The Journal of Gene Medicine*, pp. 65-77.
- Glorioso, J. C. (Fevereiro de 2014). Herpes Simplex Viral Vectors: Late Bloomers with Big Potential. *Human Gene Therapy*, pp. 83-91.
- Goff, S. P. (2013). Retroviridae. In D. M. Knipe, & P. M. Howley, *Fields Virology* (pp. 1424-1473). Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Goins, W., Cohen, J., & Glorioso, J. (Novembro de 2012). Gene therapy for the treatment of chronic peripheral nervous system pain. *Neurobiology of Disease*, pp. 255-270.

Goins, W., Krisky, D., Wechuck, J., Wolfe, D., Cohen, J., & Glorioso, J. C. (2010). Herpes Simplex Virus Vectors. In R. Herzog, & S. Zolotukhin, *A Guide to Human Gene Therapy* (pp. 69-85). Singapura: World Scientific.

Goss, J., Krisky, D., Wechuck, J., & Wolfe, D. (20 de Janeiro de 2014). Herpes simplex virus-based nerve targeting gene therapy in pain management. *Journal of Pain Research*, pp. 71-79.

Gothelf, A., & Gehl, J. (Novembro de 2012). What you always needed to know about electroporation based DNA vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, pp. 1694-1702.

Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., . . . Cavazzana-Calvo, M. (Setembro de 2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of Clinical Investigation*, pp. 3132-3142.

Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J.-P., . . . Cavazzana-Calvo, M. (18 de Abril de 2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *The New England Journal of Medicine*, pp. 1185-1193.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., . . . Cavazzana-Calvo, M. (17 de Outubro de 2003). LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science*, pp. 415-419.

Hemminki, O., & Hemminki, A. (2014). Oncolytic Adenoviruses in the Treatment of Cancer in Humans. In E. Lattime, & S. L. Gerson, *Gene Therapy of Cancer: Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation* (pp. 153-170). Londres: Academic Press.

Horiki, M., Yamato, E., Ikegami, H., Ogihara, T., & Miyazaki, J.-i. (Outubro de 2004). Needleless in vivo gene transfer into muscles by jet injection in combination with electroporation. *The Journal of Gene Medicine*, pp. 1134-1138.

Huang, S., & Kamiyama, M. (Março-Abril de 2013). Development of hybrid viral vectors for gene therapy. *Biotechnology Advances*, pp. 208-223.

- Ibraheem, D., Elaissari, A., & Fessi, H. (1 de Janeiro de 2014). Gene therapy and DNA delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 70-83.
- Jensen, S., Pedersen, A., Vissink, A., Andersen, E., Brown, C., Davies, A., . . . Brennan, M. (Agosto de 2010). A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. *Support Care Cancer*, pp. 1039-1060.
- Jeune, V. L., Joergensen, J. A., Hajjar, R. J., & Weber, T. (Abril de 2013). Pre-existing Anti-Adeno-Associated Virus Antibodies as a Challenge in AAV Gene Therapy. *Human Gene Therapy Methods*, pp. 59-67.
- Kamimura, K., Suda, T., Zhang, G., & Liu, D. (1 de Outubro de 2011). Advances in Gene Delivery Systems. *Pharmaceutical Medicine*, pp. 293-306.
- Kimmelman, J. (Março de 2008). The ethics of human gene transfer. *Nature Reviews Genetics*, pp. 239-244.
- Kohn, D. B., & Günsbacher, B. (Julho de 2003). Letter to the editors of Nature from the American Society of Gene Therapy (ASGT) and the European Society of Gene Therapy (ESGT). *The Journal of Gene Medicine*, p. 641.
- LaFave, M. C., Varshney, G. K., Gildea, D. E., Wolfsberg, T. G., Baxevanis, A. D., & Burgess, S. M. (Abril de 2014). MLV integration site selection is driven by strong enhancers and active promoters. *Nucleic Acids Research*, pp. 4257-4269.
- Ledley, F., McNamee, L., Uzdil, V., & Morgan, I. (Fevereiro de 2014). Why commercialization of gene therapy stalled; examining the life cycles of gene therapy technologies. *Gene Therapy*, pp. 188-194.
- Lewis, R. (2013). *The Forever Fix: Gene Therapy and the Boy Who Saved It*. Nova Iorque: St. Martin's Griffin.
- Li, H., Malani, N., Hamilton, S., Schlachterman, A., Bussadori, G., Edmonson, S. E., . . . High, K. (24 de Março de 2011). Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood*, pp. 3311-3319.
- Macpherson, J., & Rasko, J. (Março de 2014). Clinical potential of gene therapy: towards meeting the demand. *Internal Medicine Journal*, pp. 224-233.

Maeda, H., Tominaga, K., Iwanaga, K., Nagao, F., Habu, M., Tsujisawa, T., . . . Nishihara, T. (Agosto de 2009). Targeted drug delivery system for oral cancer therapy using sonoporation. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, pp. 572-579.

Malhotra, N., & Mala, K. (Dezembro de 2012). Regenerative endodontics as a tissue engineering approach: Past, current and future. *Australian Endodontic Journal*, pp. 137-148.

McGarritty, G., Hoyah, G., Winemiller, A., Andre, K., Stein, D., Blick, G., . . . Rebello, T. (Fevereiro de 2013). Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials. *The Journal of Gene Medicine*, pp. 78-82.

Melchiorri, D., Pani, L., Gasparini, P., Cossu, G., Ancans, J., Borg, J. J., . . . Schneider, C. K. (Setembro de 2013). Regulatory evaluation of Glybera in Europe - two committees, one mission. *Nature Reviews Drug Discovery*, pp. 719-724.

Mingozzi, F., & High, K. (4 de Julho de 2013). Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood*, pp. 23-36.

Mohit, E., & Rafati, S. (Dezembro de 2013). Biological delivery approaches for gene therapy: Strategies to potentiate efficacy and enhance specificity. *Molecular Immunology*, pp. 599-611.

Monteiro, L., Antunes, L., Bento, M., & Warnakulasuriya, S. (Abril de 2013). Incidence rates and trends of lip, oral and oro-pharyngeal cancers in Portugal. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, pp. 345-351.

Nakashima, M., Iohara, K., & Zheng, L. (Outubro de 2006). Gene therapy for dentin regeneration with bone morphogenetic proteins. *Current Gene Therapy*, pp. 551-560.

Orkin, S. H., & Motulsky, A. G. (1995). *Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy*. Washington, DC: National Institutes of Health.

Parhiz, H., Shier, W. T., & Ramezani, M. (Novembro de 2013). From rationally designed polymeric and peptidic systems to sophisticated gene delivery nano-vectors. *International Journal of Pharmaceutics*, pp. 237-259.



Peng, Z. (Setembro de 2005). Current Status of Gendicine in China: Recombinant Human Ad-p53 Agent for Treatment of Cancers. *Human Gene Therapy*, pp. 1016-1027.

Pezzoli, D., & Candiani, G. (Fevereiro de 2013). Non-viral gene delivery strategies for gene therapy: a "ménage à trois" among nucleic acids, materials, and the biological environment. *Journal of Nanoparticle Research*, pp. 1-27.

Plank, C., Zelphati, O., & Mykhaylyk, O. (Novembro de 2011). Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-Progress and prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 1300-1331.

Plemons, J., Al-Hashimi, I., & Marek, C. (Agosto de 2014). Managing xerostomia and salivary gland hypofunction: Executive summary of a report from the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *The Journal of the American Dental Association*, pp. 867-873.

Pushpendra, S., Arvind, P., & Anil, B. (2012). Nucleic Acids as Therapeutics. In V. A. Erdmann, & J. Barciszewski, *From Nucleic Acids Sequences to Molecular Medicine* (pp. 19-45). Berlin: Springer.

Ramseier, C., Rasperini, G., Batia, S., & Giannobile, W. (Junho de 2012). Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontology 2000*, pp. 185-202.

Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G.-p., . . . Batshaw, M. L. (Setembro-Outubro de 2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular Genetics and Metabolism*, pp. 148-158.

Rebello-de-Andrade, H., & Gíria, M. (2014). Adenovírus. In H. Barroso, A. Meliço-Silvestre, & N. Taveira, *Microbiologia Médica - Volume 2* (pp. 58-67). Lisboa: LIDEL.

Rios, H., Lin, Z., Oh, B., Park, C., & Giannobile, W. (Setembro de 2011). Cell- and Gene-Based Therapeutic Strategies for Periodontal Regenerative Medicine. *Journal of Periodontology*, pp. 1223-1237.

Rizk, A., & Rabie, B. M. (Abril de 2013). Electroporation for Transfection and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *BioResearch Open Access*, pp. 155-162.

Roizman, B., Knipe, D. M., & Whitley, R. J. (2013). Herpes Simplex Viruses. In D. Knipe, & P. Howley, *Fields Virology* (pp. 1823-1897). Filadélfia: Lippincott, Williams & Wilkins.

Romero-Reyes, M., & Uyanik, J. (21 de Fevereiro de 2014). Orofacial pain management: current perspectives. *Journal of Pain Research*, pp. 99-115.

Russell, R. (2008). Might caries control involve immunization and gene therapy? In O. Fejerskov, E. Kidd, B. Nyvad, & V. Baelum, *Dental Caries: The Disease and its Clinical Management* (pp. 280-286). Oxford: Blackwell Munksgaard.

Samuni, Y., & Baum, B. (Novembro de 2011). Gene delivery in salivary glands: from the bench to the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 1515-1521.

Sasportas, L., Hosford, D., Sodini, M., Waters, D., Zambricki, E., Barral, J., . . . Sirjani, D. (Julho de 2013). Cost-effectiveness landscape analysis of treatments addressing xerostomia in patients receiving head and neck radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, pp. e37-e51.

Schambach, A., Zychlinski, D., Ehrnstroem, B., & Baum, C. (Fevereiro de 2013). Biosafety Features of Lentiviral Vectors. *Human Gene Therapy*, pp. 132-142.

Scheller, E., Villa-Diaz, L., & Krebsbach, P. (Janeiro de 2012). Gene Therapy: Implications for Craniofacial Regeneration. *The Journal of Craniofacial Surgery*, pp. 333-337.

Schramm-Baxter, J., & Mitragotri, S. (7 de Julho de 2004). Needle-free jet injections: dependence of jet penetration and dispersion in the skin on jet power. *Journal of Controlled Release*, pp. 527-535.

Sheridan, C. (Fevereiro de 2011). Gene therapy finds its niche. *Nature Biotechnology*, pp. 121-128.

Shirley, S., Heller, R., & Heller, L. (2014). Electroporation Gene Therapy. In E. Lattime, & S. Gerson, *Gene Therapy of Cancer: Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation* (pp. 93-106). Londres: Academic Press.

- Simon, S., Berdal, A., Cooper, P., Lumley, P., Tomson, P., & Smith, A. (Julho de 2011). Dentin-Pulp Complex Regeneration: from Lab to Clinic. *Advances in Dental Research*, pp. 340-345.
- Steinbrook, R. (2008). The Gelsinger Case. In E. J. Emanuel, C. C. Grady, R. A. Crouch, R. K. Lie, F. G. Miller, & D. D. Wendler, *The Oxford Textbook of Clinical Research Ethics* (pp. 110-120). Oxford: Oxford University Press.
- Strachan, T., & Read, A. (2011). *Human Molecular Genetics*. Nova Iorque: Garland Science.
- Suda, T., & Liu, D. (Dezembro de 2007). Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications. *Molecular Therapy*, pp. 2063-2069.
- Sugano, M., Negishi, Y., Endo-Takahashi, Y., Hamano, N., Usui, M., Suzuki, R., . . . Yamamoto, M. (Junho de 2014). Gene delivery to periodontal tissue using Bubble liposomes and ultrasound. *Journal of Periodontal Research*, pp. 398-404.
- Timiri Shanmugam, P., Dayton, R., Palaniyandi, S., Abreo, F., Caldito, G., Klein, R., & Sunavala-Dossabhoy, G. (Junho de 2013). Recombinant AAV9-TLK1B Administration Ameliorates Fractionated Radiation-Induced Xerostomia. *Human Gene Therapy*, pp. 604-612.
- Tzabazis, A., Klukinov, M., Feliciano, D., Wilson, S., & Yeomans, D. (Abril de 2014). Gene therapy for trigeminal pain in mice. *Gene Therapy*, pp. 422-426.
- Uchida, M., Li, X., Mertens, P., & Alpar, H. (Agosto de 2009). Transfection by particle bombardment: Delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochimica et Biophysica Acta*, pp. 754-764.
- van Putten, E. H., Dirven, C. M., van den Bent, M. J., & Lamfers, M. L. (Novembro de 2010). Sitimagene ceradenovec: a gene-based drug for the treatment of operable high-grade glioma. *Future Oncology*, pp. 1691-1710.
- Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., & Pistello, M. (Janeiro de 2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiologica*, pp. 1-22.

Villemejjane, J., & Mir, L. (Maio de 2009). Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *British Journal of Pharmacology*, pp. 207-219.

Vit, J.-P., Ohara, P., Sundberg, C., Rubi, B., Maechler, P., Liu, C., . . . Jasmin, L. (5 de Agosto de 2009). Adenovector GAD65 gene delivery into the rat trigeminal ganglion produces orofacial analgesia. *Molecular Pain*.

Ward, P., & Walsh, C. (25 de Novembro de 2012). Targeted integration of a rAAV vector into the AAVS1 region. *Virology*, pp. 356-366.

Wilson, J. M. (Abril de 2009). Lessons learned from the gene therapy trial for ornithine transcarbamylase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, pp. 151-157.

Wirth, T., Parker, N., & Ylä-Herttuala, S. (10 de Agosto de 2013). History of gene therapy. *Gene*, pp. 162-169.

Wold, W. S., & Ison, M. G. (2013). Adenoviruses. In D. M. Knipe, & P. Howley, *Fields Virology* (pp. 1732-1767). Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins.

Yi, Y., Noh, M. J., & Lee, K. H. (Junho de 2011). Current Advances in Retroviral Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, pp. 218-228.

Yokoo, T., Kamimura, K., Suda, T., Kanefuji, T., Oda, M., Zhang, G., . . . Aoyagi, Y. (Agosto de 2013). Novel electric power-driven hydrodynamic injection system for gene delivery: safety and efficacy of human factor IX delivery in rats. *Gene Therapy*, pp. 816-823.

Zheng, C., Cotrim, A., Rowzee, A., Swaim, W., Sowers, A., Mitchell, J., & Baum, B. (1 de Maio de 2011). Prevention of Radiation-Induced Salivary Hypofunction Following hKGF Gene Delivery to Murine Submandibular Glands. *Clinical Cancer Research*, pp. 2842-51.

# **ANEXOS**

## A Terapia Génica em Portugal

Em Portugal um medicamento de terapia génica é considerado um medicamento de terapia avançada, de acordo com o decreto-lei nº 64/2010 de 9 de Junho. O ponto 2 do artigo 8º do decreto-lei nº 12/2005, de 26 de Janeiro, determina que “é proibida qualquer intervenção médica que tenha por objetivo a manipulação genética de características consideradas normais, bem como a alteração da linha germinativa de uma pessoa”, sendo assim ilegal a terapia génica germinal e qualquer terapia génica com fins eugénicos ou disgénicos. O recente regulamento (UE) nº 536/2014 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Abril de 2014, estipula as mesmas restrições.

Também recentemente foi aprovada e publicada em Diário da República a lei nº 21/2014, de 16 de Abril, com o intuito de regulamentar a investigação clínica portuguesa. Assim, para a execução de um ensaio clínico em Portugal será necessária, através do Registo Nacional de Estudos Clínicos (RNEC), a autorização do INFARMED e de uma Comissão de Ética Competente (CEC), que poderá ser a Comissão de Ética para a Investigação Clínica (CEIC) e/ou uma Comissão de Ética para a Saúde (CES). Atualmente não existem ensaios clínicos de terapia génica registados em Portugal (<https://www.clinicaltrialsregister.eu/> consultado dia 11 de Agosto de 2014 às 17h45).

Existem dois laboratórios em Portugal que trabalham na área da terapia génica:

- Instituto de Tecnologia Química e Biológica (Universidade Nova de Lisboa)

Este instituto tem na sua formação uma equipa que se dedica à produção e purificação de diversos vetores virais, tais como os baseados em retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associados e baculovírus, tendo muita publicação científica.

<http://www.itqb.unl.pt/labs/animal-cell-technology/activities/viral-vectors-for-gene-therapy>

<http://www.itqb.unl.pt/labs/animal-cell-technology/publications/by-area-1/gene-therapy>

- Centro de Neurociências e Biologia Celular (Universidade de Coimbra)

No âmbito da terapia génica, a investigação neste centro tem-se centrado no desenho e desenvolvimento de vetores, incluindo vetores virais e não virais, para o transporte de fármacos e ácidos nucleicos, com o objectivo de serem aplicados como plataformas

tecnológicas para 1) o estabelecimento de modelos de doenças, 2) o estudo dos mecanismos de doença e 3) o desenvolvimento de novas estratégias moleculares terapêuticas e profiláticas.

Os estudos sobre transportadores não virais têm focado essencialmente a avaliação do potencial de novos nanossistemas de base lipídica e de nanopartículas poliméricas em estratégias de terapia génica com vista ao tratamento de cancro e doenças neurodegenerativas, bem como para o desenvolvimento de vacinas contra doenças infecciosas.

Os vetores virais, especificamente baseados em lentivírus e vírus adeno-associados, têm sido explorados para terapia génica para o sistema nervoso central, nomeadamente com o propósito de investigar a patogénese e desenvolver modelos de doenças neurodegenerativas, com particular ênfase na doença de Machado-Joseph.

*[http://www.cnb.pt/research/departament\\_group\\_show.asp?iddep=1221&idgrp=1222&lg=1](http://www.cnb.pt/research/departament_group_show.asp?iddep=1221&idgrp=1222&lg=1)*

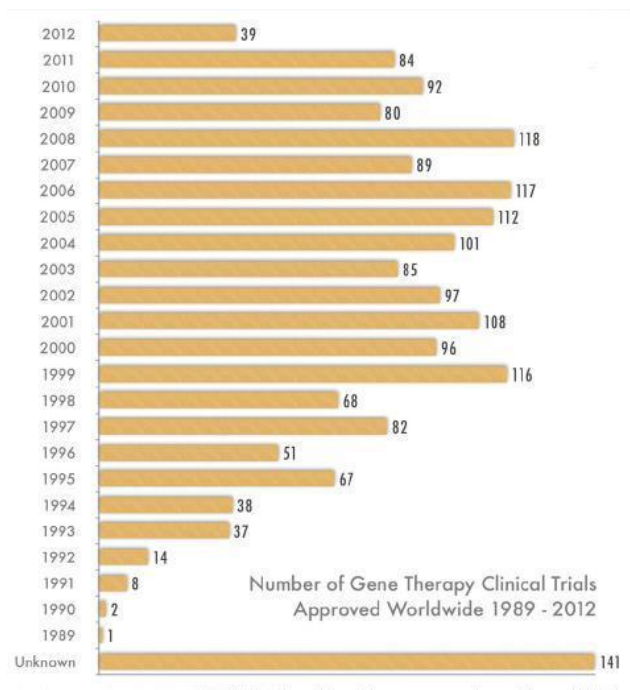


Figura 1 – Número de ensaios clínicos de terapia génica aprovados em todo o Mundo (Ginn et al., 2013);

Geographical Distribution of Gene Therapy Clinical Trials (by Country)

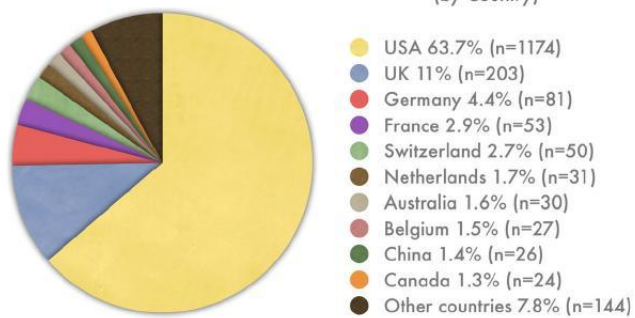


Figura 2 – Distribuição geográfica dos ensaios clínicos de terapia génica (Ginn et al., 2013);

Indications Addressed by Gene Therapy Clinical Trials

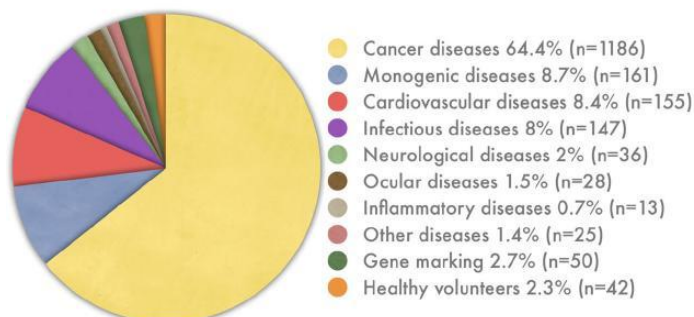


Figura 3 – Doenças sobre as quais incidem os ensaios clínicos (Ginn et al., 2013);



## Phases of Gene Therapy Clinical Trials

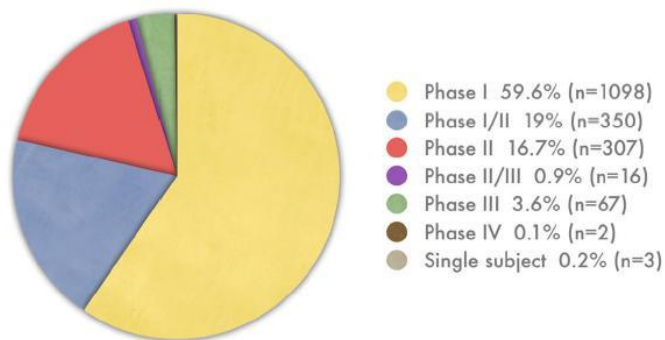


Figura 4 – Fases dos ensaios clínicos aprovados mundialmente (Ginn et al., 2013);

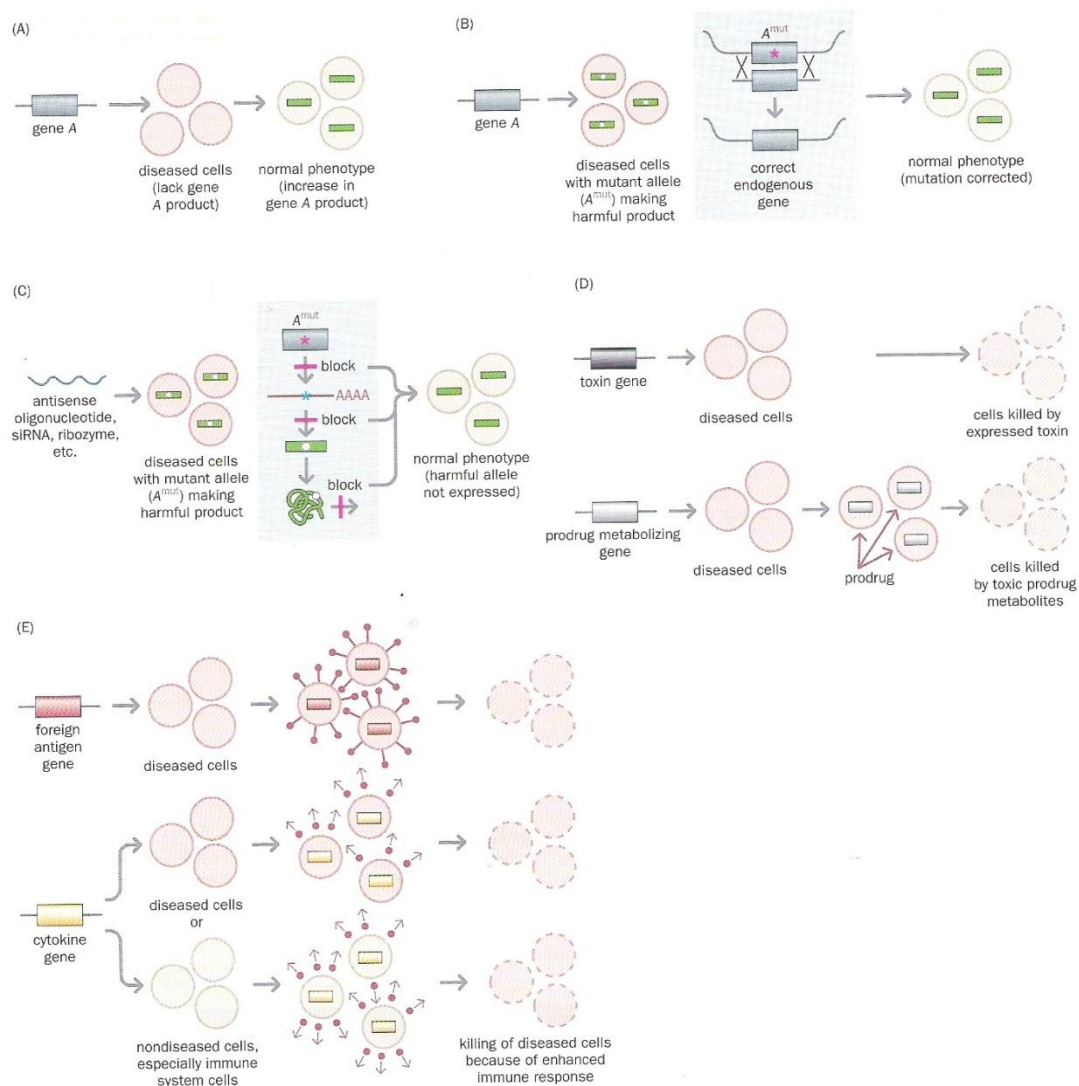


Figura 5 – Estratégias para a modificação das células-alvo (Strachan & Read, 2011); A – Adição Génica; B – Eliminação de Mutações Patogénicas; C – Inibição da Expressão Génica; D – Morte Direta de Células Afetadas; E – Morte Assistida de Células Afetadas ou Imunoterapia;

Protein-coding DNA sequences	Proteins substituting missing or mutated cellular proteins Proteins modulating cellular functions Secreted growth factors and cytokines Proteins regulating cell survival and apoptosis Antigens for vaccination Antibodies and intracellular antibodies T-cell receptor (TCR) subunits	
Non-coding nucleic acids	Oligonucleotides and modified oligonucleotides	Phosphorothioate oligonucleotides 2'-Ribose modified oligonucleotides Locked nucleic acids (LNA) and ethylene-bridged nucleic acids (ENA) Morpholinos (PMO) Peptide nucleic acids (PNA)
		Catalytic RNAs and DNAs
		Small regulatory RNAs
		Long antisense RNAs
		Decoys
		Aptamers
		Ribozymes and DNAzymes
		siRNAs and shRNAs, microRNAs

Tabela 1 – Ácidos Nucleicos Terapêuticos (Giacca, 2010);

Gene Types Transferred in Gene Therapy Clinical Trials

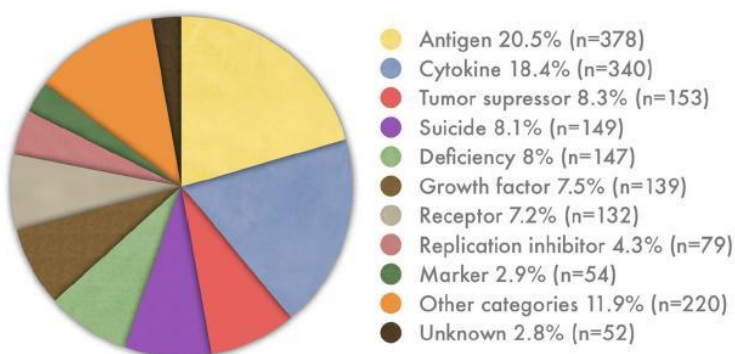


Figura 6 – Tipos de genes transferidos nos ensaios clínicos de terapia génica (Ginn et al., 2013);

Vectors Used in Gene Therapy Clinical Trials

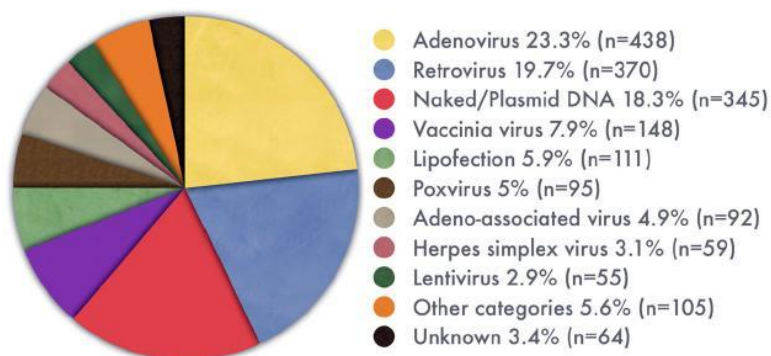


Figura 7 – Vetores usados nos ensaios clínicos de terapia génica (Ginn et al., 2013);

Vector	Plasmid	RV	LV	AdV	AAV	HSV
1) Genome size	Varies	~ 10 kb	~10 kb	~40 kb	~5 kb	~ 150 kb
2) Payload size	Varies	++	++	+++	+	++++
(a) Size	Varies	~ 7 kb	~6.5 kb	~7–36 kb	~3–4.5 kb	~ 40 kb +
(b) Genes	Varies	1–2	1–2	1–many	1	1–many
3) Host range	Varies	Limited	Limited <sup>a</sup>	Broad	Broad	Broad
(a) Dividing	+	+	+	+	+	+
(b) Non-dividing	+/-	—	+	+	+	+
4) Transduction efficiency	Low	High	High	Med ( $10^2$ – $10^3$ )	Low–med ( $10^3$ – $10^5$ )	High (1–10) Med–high
5) Genome stability	Low	High	High	Low	High	Med–high
(a) Episomal	+	—	—	++	+	+++
(b) Integrated	+/-	++	++	—	++	—
6) Transgene expression	Med	Med	Med	High	Med	Med
(a) Short-term	+	+	+	+++	+	++
(b) Long-term	—	++	++	—	++	+/-
7) Production	Easy	Easy	Easy	Easy	Easy–hard	Hard
(a) Cell lines	—	+	+	+	+	+
(b) Kits	+	+	+	+	+	—
(c) Cost	High <sup>b</sup>	Low	Low	Low	Med	Low
8) Titers (TU/mL)		$10^5$ – $10^7$	$10^6$ – $10^8$	$10^{10}$ – $10^{13}$	$10^8$ – $10^{12}$	$10^9$ – $10^{11}$
9) Safety	+++	+/-	+/-	—	++/-	+
(a) Tumors	—	++	++	—	+/-	—
(b) Recomb.	—	++	++	+	+	+/-
(c) IR	++	—	—	+++++	+++	+/-
(d) Cytotoxicity	+/-	—	—	+++	—	+/-
10) Repeat Dosing	+	+/-	+/-	—	— (Eye +) <sup>c</sup>	++

Abbreviations: AAV, adeno-associated virus; AdV, adenovirus; HSV, herpes simplex virus; IR, immune response; kb, kilobase; LV, lentivirus; mL, milliliters; RV, retrovirus; TU, transducing units.

<sup>a</sup> Host range of pseudotyped LV varies with the glycoproteins employed which affects transduction efficiency.

<sup>b</sup> Plasmid DNA preparations in mg/mL rather than TU/mL.

<sup>c</sup> AAV repeat dosing has been achieved during vector delivery to the eye/retina.

Tabela 2 – Principais características de cada vetor (Goins et al., 2012);

<b>Monogenic disorders</b>	<b>Cancer</b>
Adrenoleukodystrophy	<i>Gynaecological</i> – breast, ovary, cervix, vulva
$\alpha$ -1 antitrypsin deficiency	<i>Nervous system</i> – glioblastoma, leptomeningeal carcinomatosis, glioma, astrocytoma, neuroblastoma, retinoblastoma
Becker muscular dystrophy	<i>Gastrointestinal</i> – colon, colorectal, liver metastases, post-hepatitis liver cancer, pancreas, gall bladder
$\beta$ -thalassaemia	<i>Genitourinary</i> – prostate, renal, bladder, anogenital neoplasia
Canavan disease	<i>Skin</i> – melanoma (malignant/metastatic)
Chronic granulomatous disease	<i>Head and neck</i> – nasopharyngeal carcinoma, squamous cell carcinoma, oesophageal cancer
Cystic fibrosis	<i>Lung</i> – adenocarcinoma, small cell/nonsmall cell, mesothelioma
Duchenne muscular dystrophy	<i>Haematological</i> – leukaemia, lymphoma, multiple myeloma
Fabry disease	<i>Sarcoma</i>
Familial adenomatous polyposis	<i>Germ cell</i>
Familial hypercholesterolaemia	<i>Li-Fraumeni syndrome</i>
Fanconi anaemia	<i>Thyroid</i>
Galactosialidosis	<b>Neurological diseases</b>
Gaucher's disease	Alzheimer's disease
Gyrate atrophy	Amyotrophic lateral sclerosis
Haemophilia A and B	Carpal tunnel syndrome
Hurler syndrome	Cubital tunnel syndrome
Hunter syndrome	Diabetic neuropathy
Huntington's chorea	Epilepsy
Junctional epidermolysis bullosa	Multiple sclerosis
Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis	Myasthenia gravis
Leukocyte adherence deficiency	Parkinson's disease
Limb girdle muscular dystrophy	Peripheral neuropathy
Lipoprotein lipase deficiency	Pain
Mucopolysaccharidosis type VII	<b>Ocular diseases</b>
Omithine transcarbamylase deficiency	Age-related macular degeneration
Pompe disease	Diabetic macular edema
Purine nucleoside phosphorylase deficiency	Glaucoma
Recessive dystrophic epidermolysis bullosa	Retinitis pigmentosa
Sickle cell disease	Superficial corneal opacity
Severe combined immunodeficiency	Choroideraemia
Tay Sachs disease	Leber congenital amaurosis
Wiskott-Aldrich syndrome	<b>Inflammatory diseases</b>
<b>Cardiovascular disease</b>	Arthritis (rheumatoid, inflammatory, degenerative)
Anaemia of end stage renal disease	Degenerative joint disease
Angina pectoris (stable, unstable, refractory)	Ulcerative colitis
Coronary artery stenosis	Severe inflammatory disease of the rectum
Critical limb ischaemia	<b>Other diseases</b>
Heart failure	Chronic renal disease
Intermittent claudication	Erectile dysfunction
Myocardial ischaemia	Detrusor overactivity
Peripheral vascular disease	Parotid salivary hypofunction
Pulmonary hypertension	Oral mucositis
Venous ulcers	Fractures
<b>Infectious disease</b>	Type I diabetes
Adenovirus infection	Diabetic ulcer/foot ulcer
Cytomegalovirus infection	Graft versus host disease/transplant patients
Epstein-Barr virus	
Hepatitis B and C	
HIV/AIDS	
Influenza	
Japanese encephalitis	
Malaria	
Paediatric respiratory disease	
Respiratory syncytial virus	
Tetanus	
Tuberculosis	

Tabela 3 – Patologias para as quais foram aprovados ensaios clínicos humanos de terapia génica. Sublinhado a amarelo estão as aplicações desta terapia na área médico-dentária (adaptado de Ginn et al., 2013);